

# ΔΙΔΑΚΤΕΑ ΥΛΗ

## Gene Cloning (T.A. Brown)

Part 1, 2

## Ανασυνδυασμένο DNA (D. Watson et al.)

Κεφάλαιο 4

Κεφάλαιο 6 [εκτός σελίδες: 182-185, 196-207]

Κεφάλαιο 10 [σελίδες 235-354]

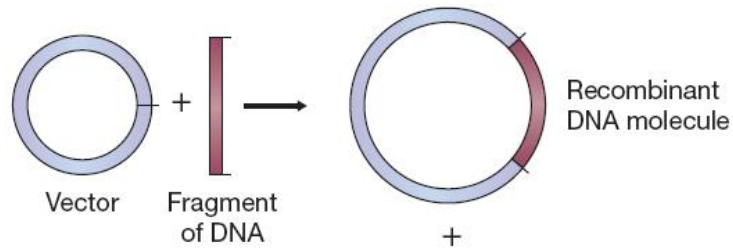
Κεφάλαιο 13 [σελίδες: 446-456]

# Ανασυνδυασμένο DNA

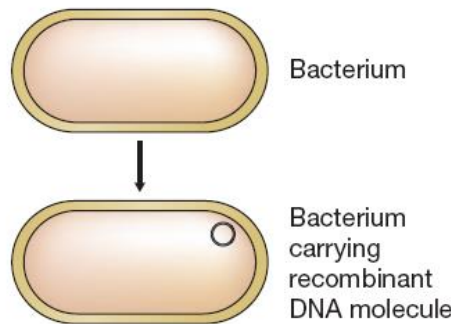
- Ρύθμιση των γονιδίων
- Λειτουργία των γονιδίων
- Ιατρική διαγνωστική
- Φαρμακευτικά, γεωργικά, βιομηχανικά προϊόντα
- Γονιδιακή θεραπεία

# Κλωνοποίηση

## 1 Construction of a recombinant DNA molecule



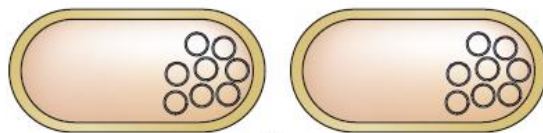
## 2 Transport into the host cell



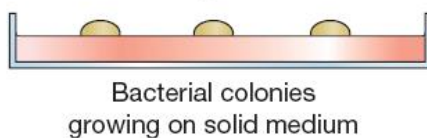
## 3 Multiplication of recombinant DNA molecule



## 4 Division of host cell

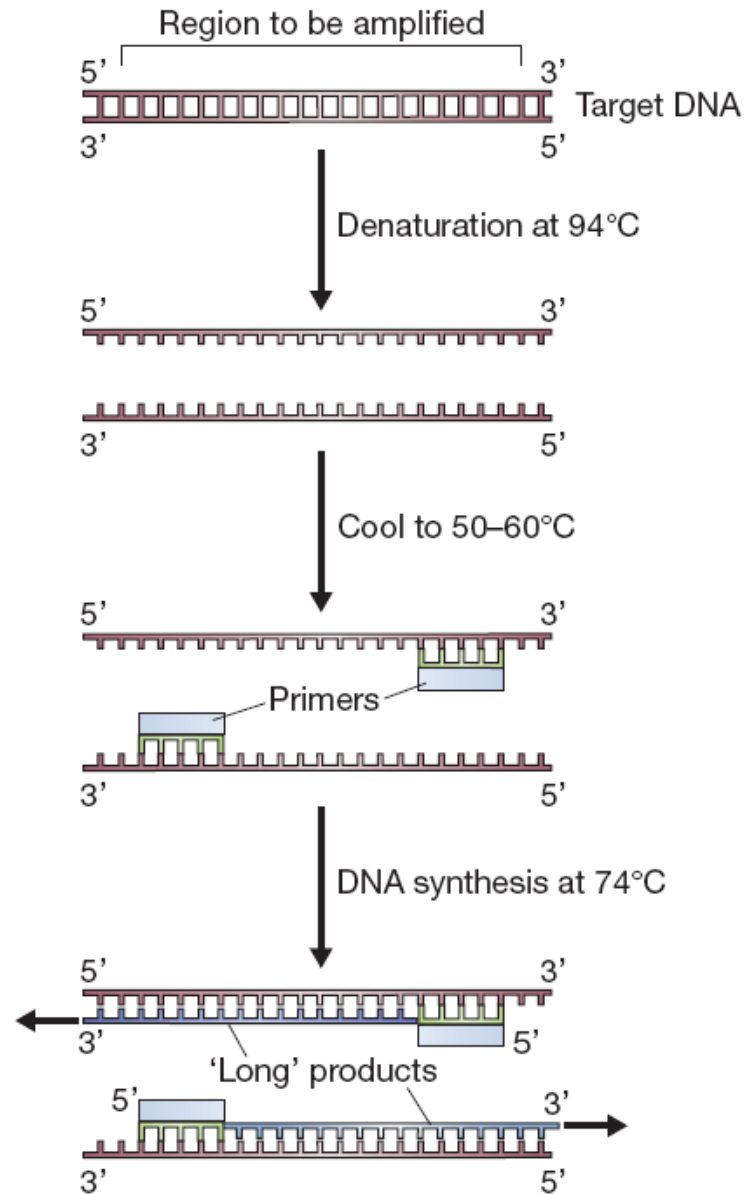


## 5 Numerous cell divisions resulting in a clone

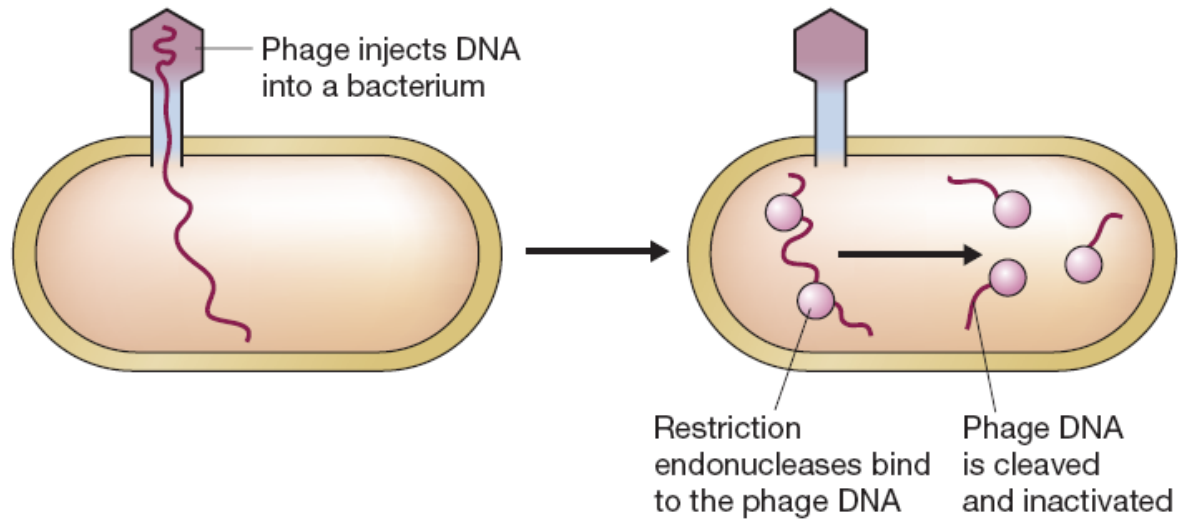


# PCR

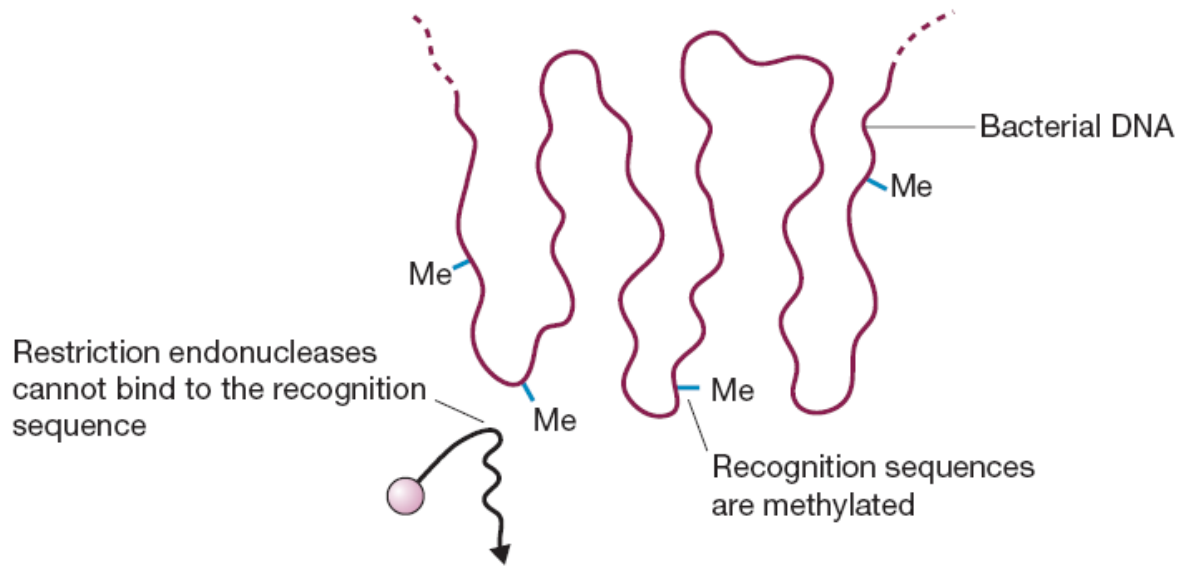
# F- 1.1, 9.2



(a) Restriction of phage DNA



(b) Bacterial DNA is not cleaved



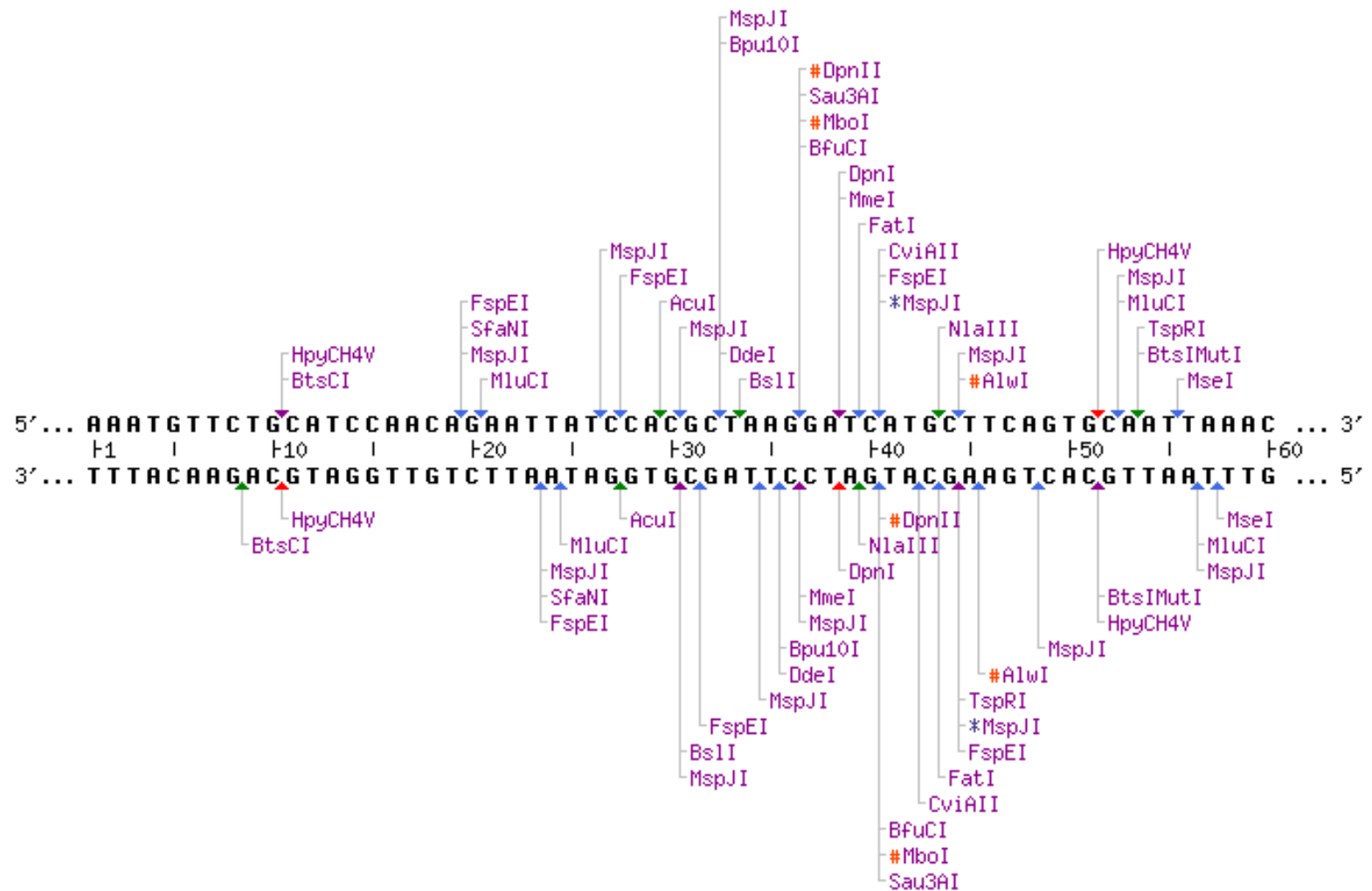
# Ένζυμα περιορισμού

# Πίνακας 4.1

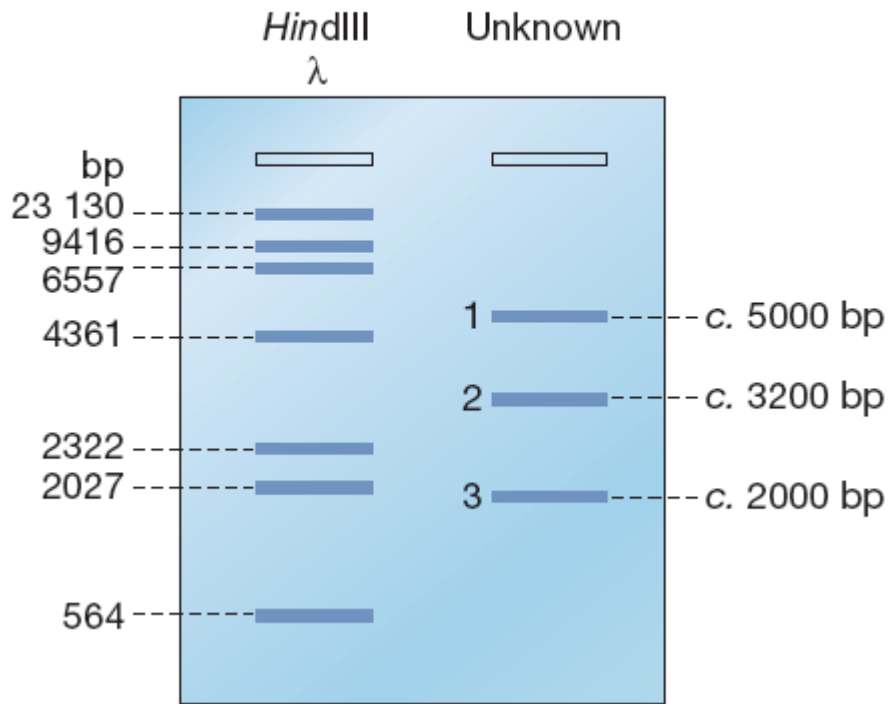
Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σημειώσεις
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	5' ... G G C C... 3' 3' ... C C G G... 5'	Λεία άκρα
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'	5' μονόκλωνα άκρα
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'	3' μονόκλωνα άκρα
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'	
<i>Moraxella bovis</i>	MboII	5' ... G A A G A (N) <sub>8</sub>   ... 3' 3' ... C T T C T (N) <sub>7</sub>   ... 5'	
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'	
	EcoRI	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'	
<i>Providencia stuarti</i>	PstI	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'	
<i>Microcoleus</i>	MstII	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G G A N T C C ... 5'	
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	5' ... G C G G C C G C ... 3' 3' ... C G C C G G C G ... 5'	

Τα περισσότερα ένζυμα είναι ομοδιμερή αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες

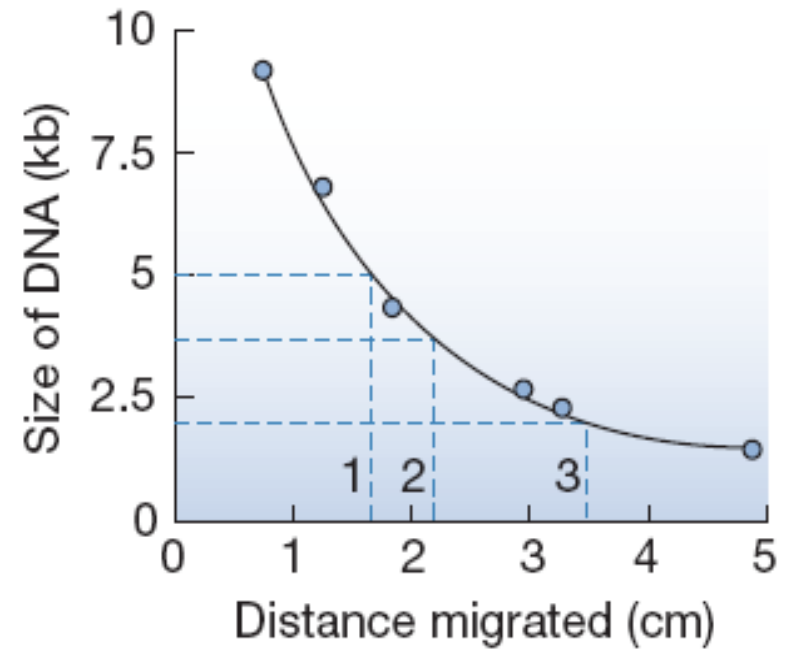
# Ένζυμα περιορισμού



(a) Rough estimation by eye



(b) Accurate graphical estimation

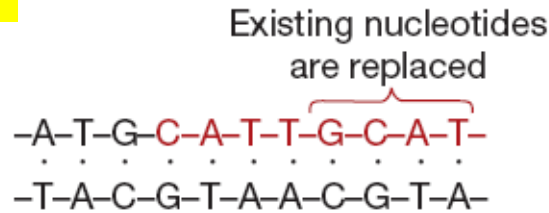
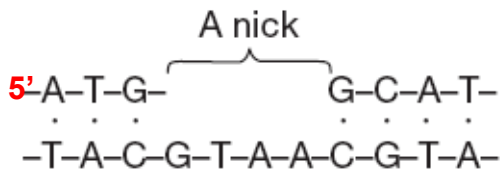


## Ένζυμα με συμβατά άκρα

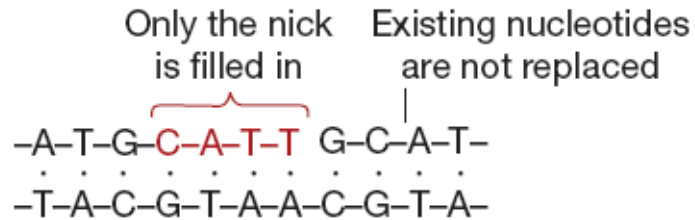
Ένζυμο	Αλληλουχία	Προϊόν	Μονόκλιωνα άκρα
BamHI	GGATCC	<b>G</b> GATCC CCTAG <b>G</b>	5'-GATC
BglII	AGATCT	<b>A</b> GATCT TCTAG <b>A</b>	5'-GATC
BclI	TGATCA	<b>T</b> GATCA ACTAG <b>T</b>	5'-GATC
Sau3AI	NGATCN	<b>N</b> GATCN NCTAG <b>N</b>	5'-GATC



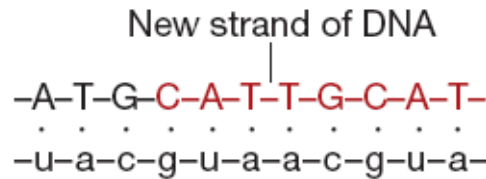
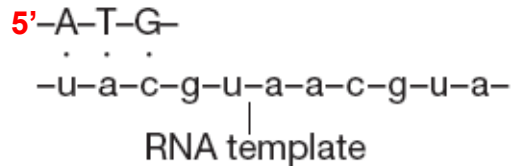
(b) DNA polymerase I **5'→3' & 3'→5' έξω**



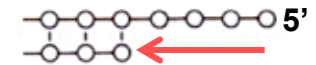
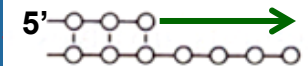
(c) The Klenow fragment (T4 DNA πολυμεράση) **3'→5' έξω**



(d) Reverse transcriptase



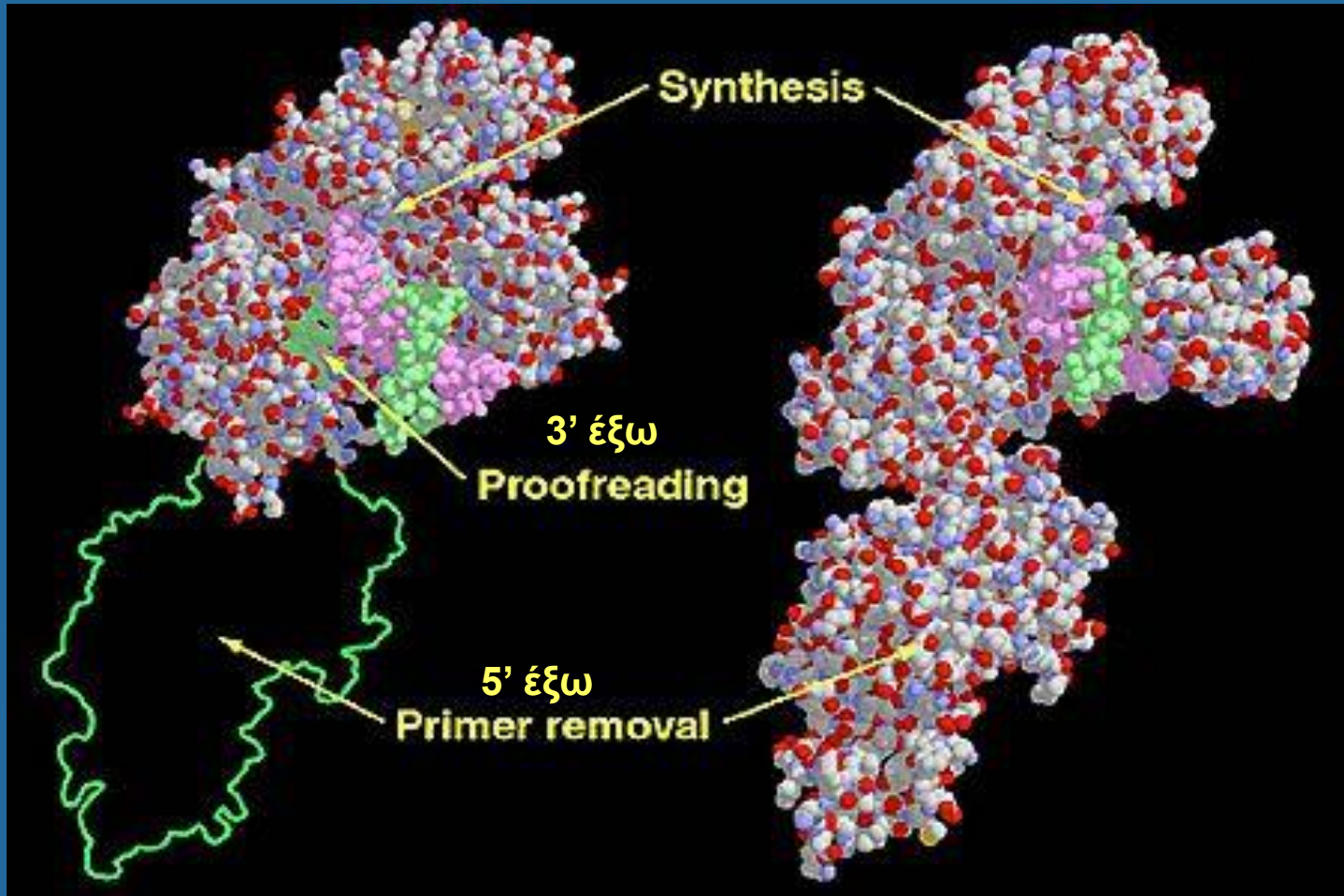
Γέμισμα



Άδειασμα

Klenow

DNA πολυμεράση I



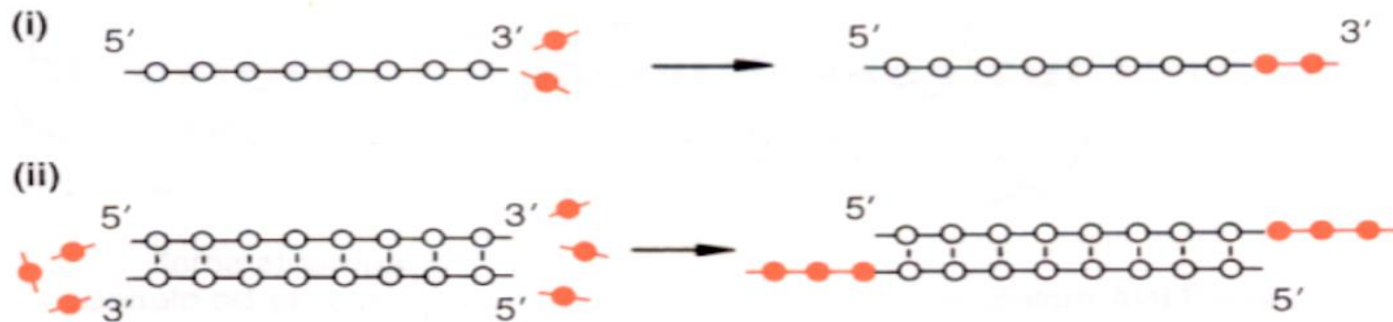
(a) Alkaline phosphatase



(b) Polynucleotide kinase



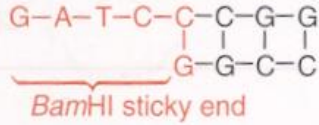
(c) Terminal deoxynucleotidyl transferase



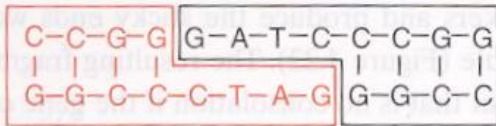
# Adaptors (Προσαρμοστές)

F-4.23, 4.25

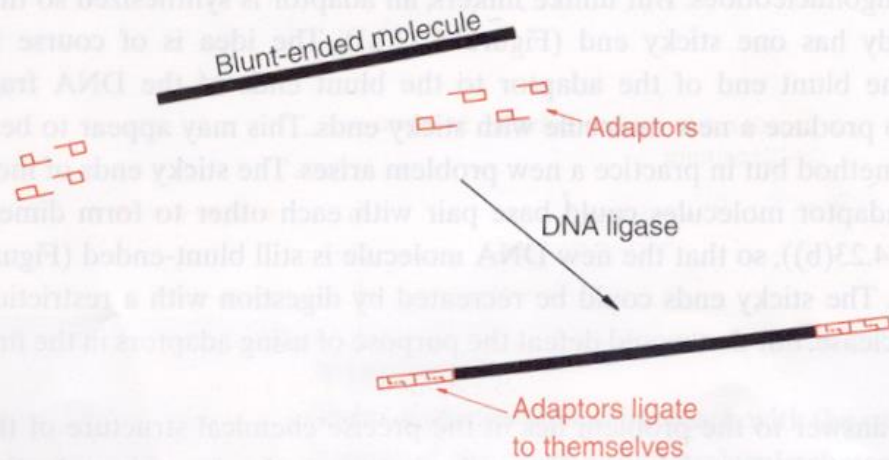
(a) A typical adaptor



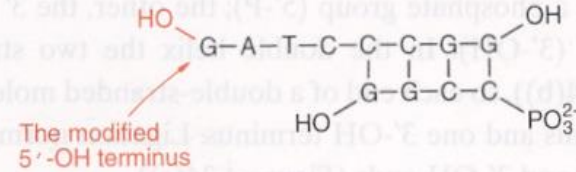
(b) Adaptors could ligate to one another



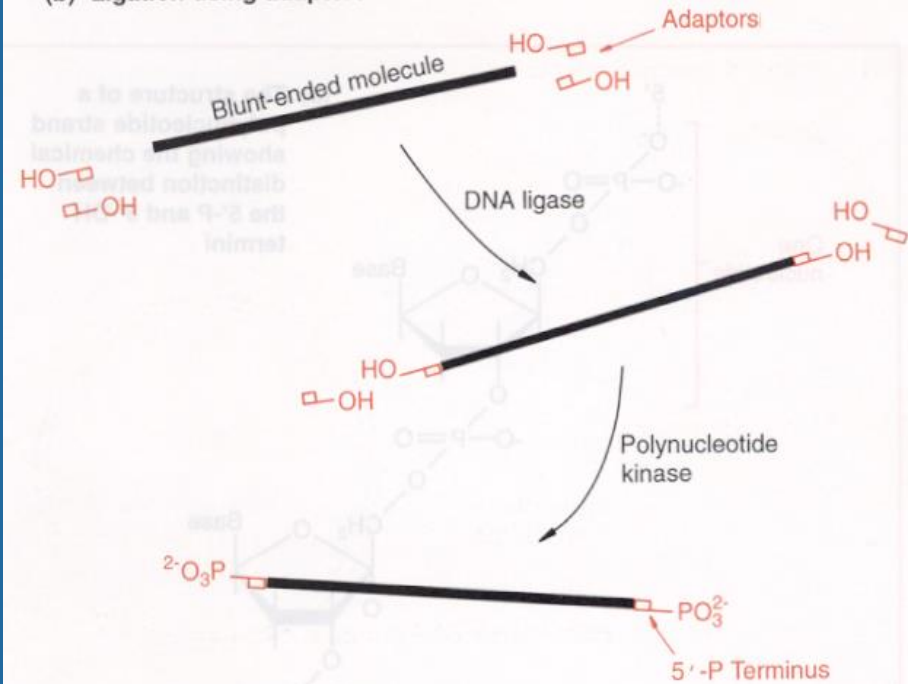
(c) The new DNA molecule is still blunt-ended



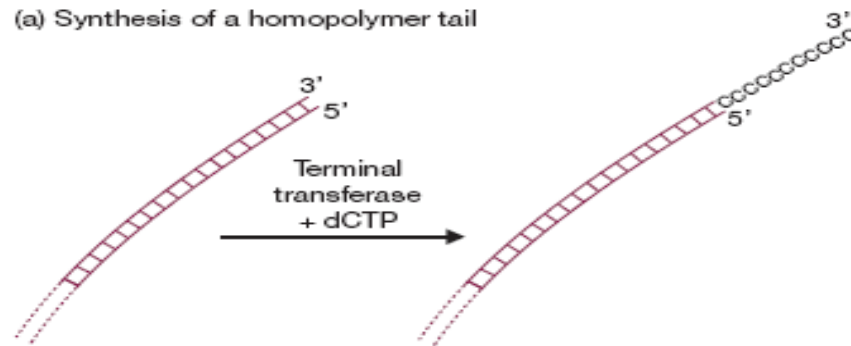
(a) The precise structure of an adaptor



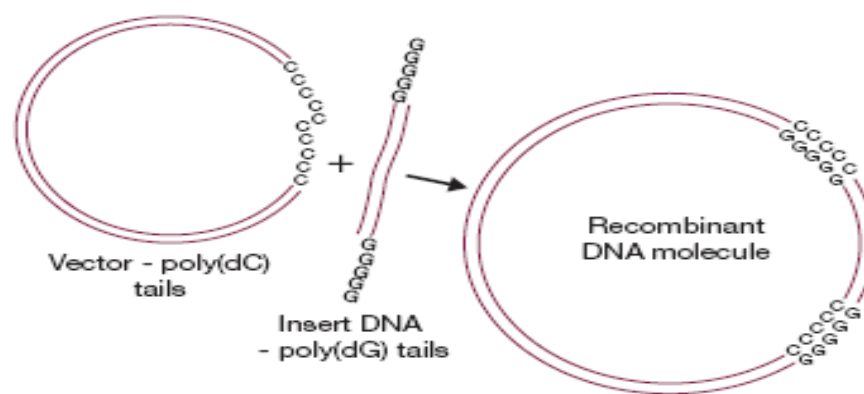
(b) Ligation using adaptors



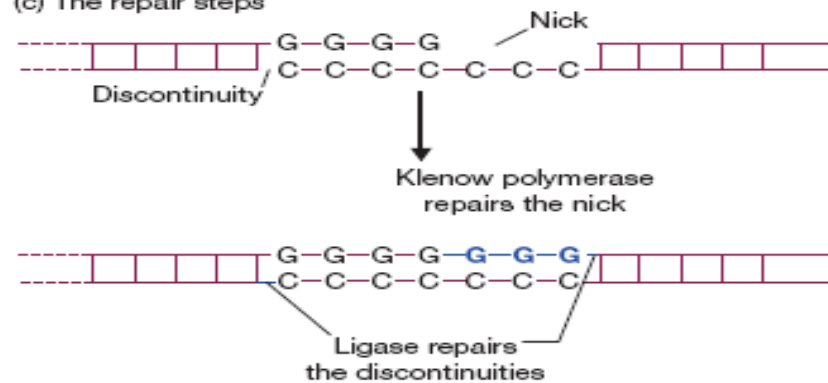
(a) Synthesis of a homopolymer tail



(b) Ligation of homopolymer tails

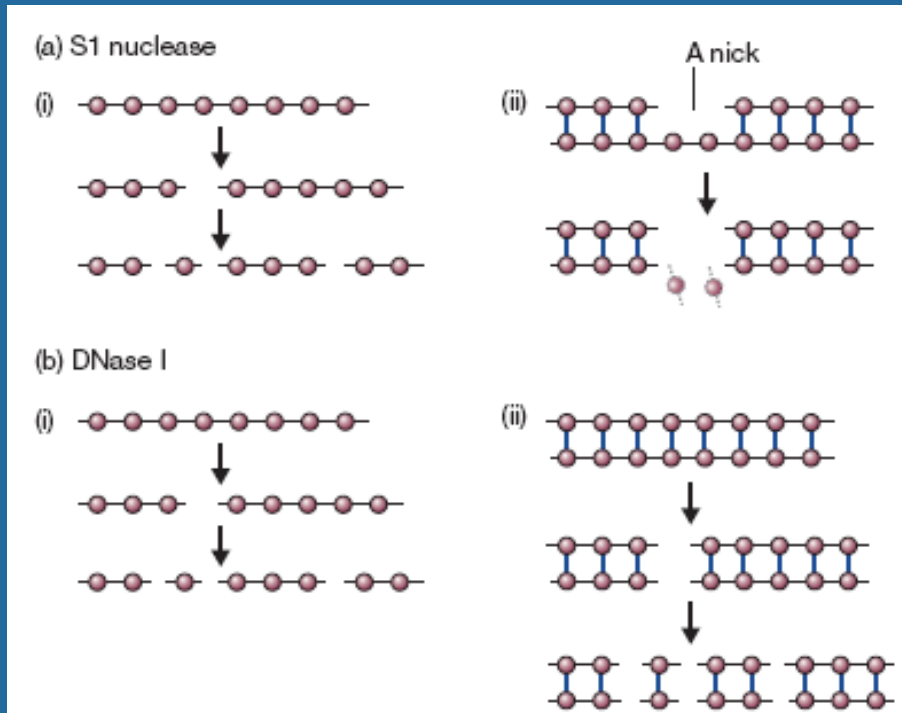


(c) The repair steps



# Νουκλεάσες

F- 4.2, 4.3



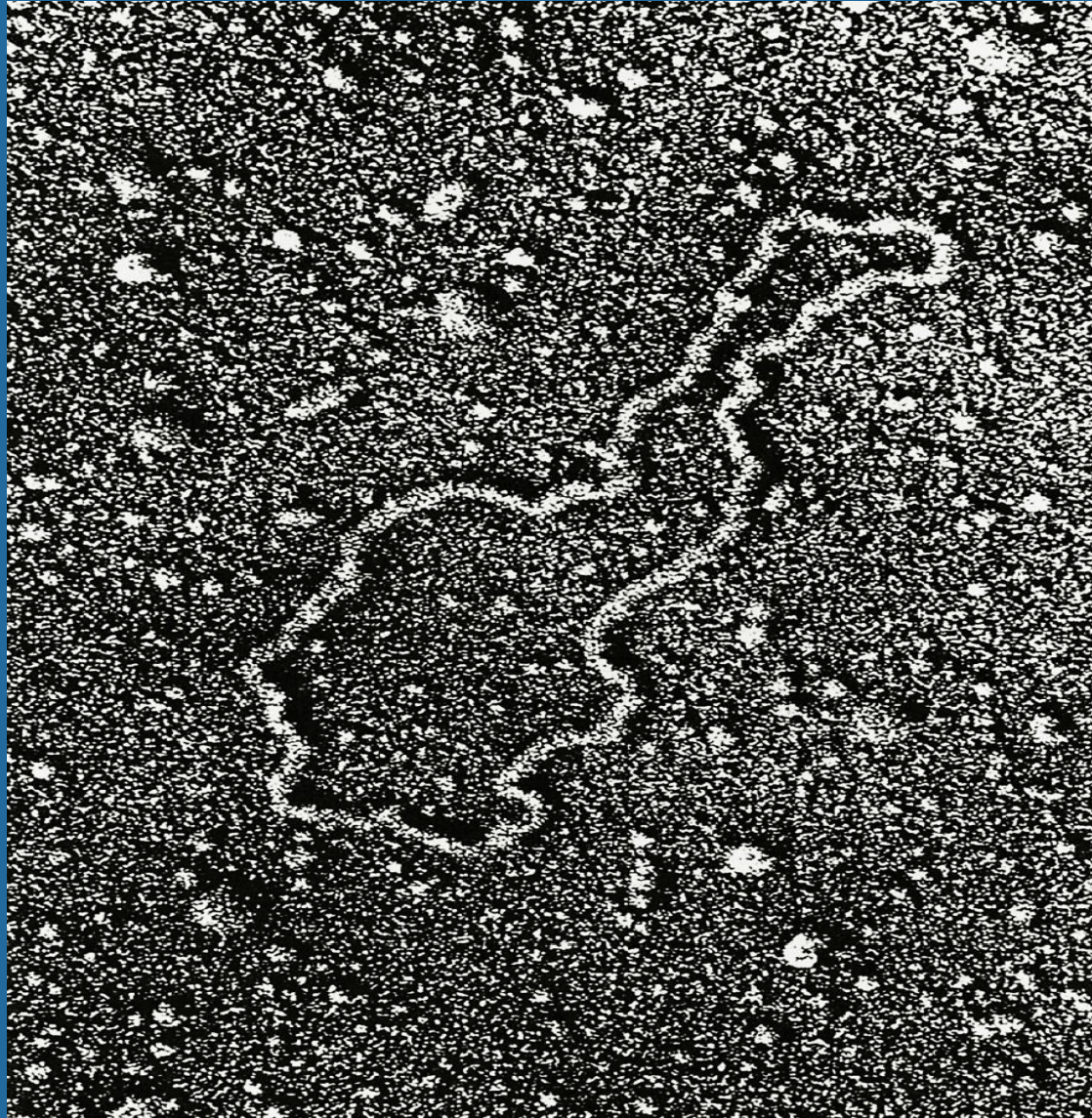
S1 νουκλεάση: S (DNA & RNA)

DNάση I: D,S (DNA & DNA-RNA)

Μικροκοκκική νουκλεάση-D/S (DNA & RNA)



# Κλωνοποίηση σε πλασμίδια



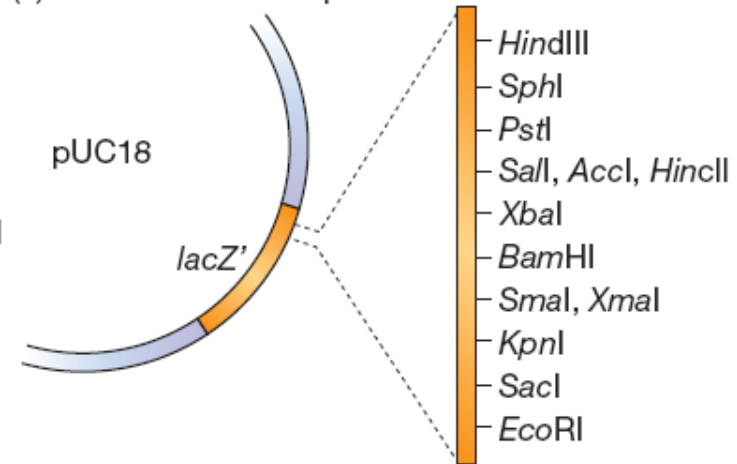
(a) pUC8



(b) Restriction sites in pUC8



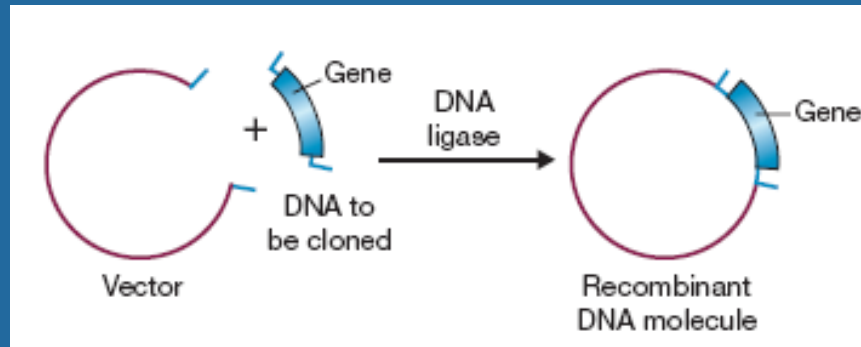
(c) Restriction sites in pUC18





# Σύνδεση τμημάτων DNA

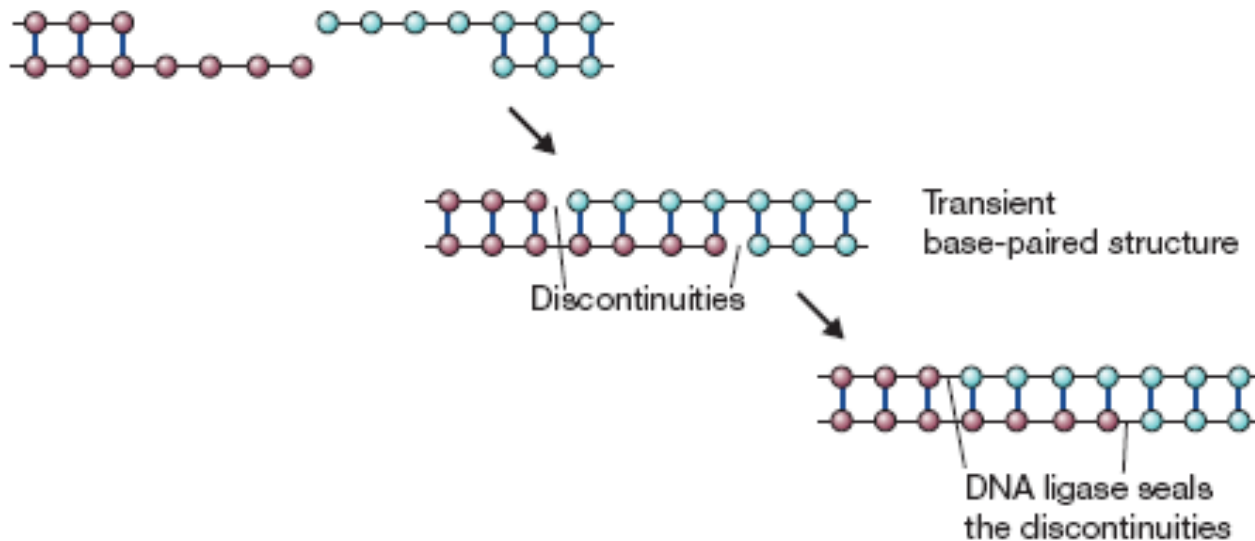
F- 4.19, 4.20



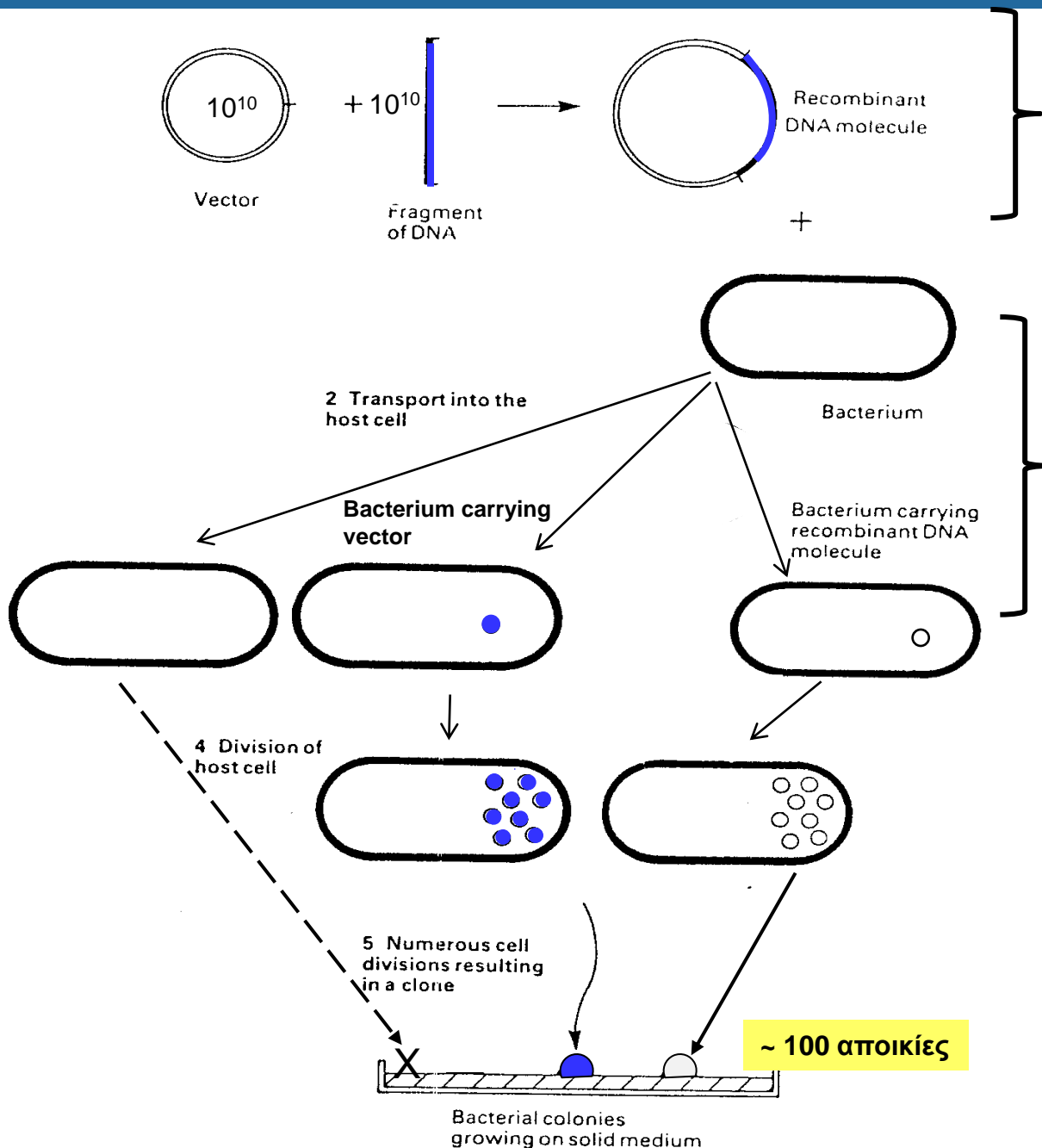
(a) Ligating blunt ends



(b) Ligating sticky ends



# Κλωνοποίηση σε πλασμίδια



Συχνότητα ανασυνδυασμένων πλασμιδίων:  $10^{-3} - 10^{-4}$

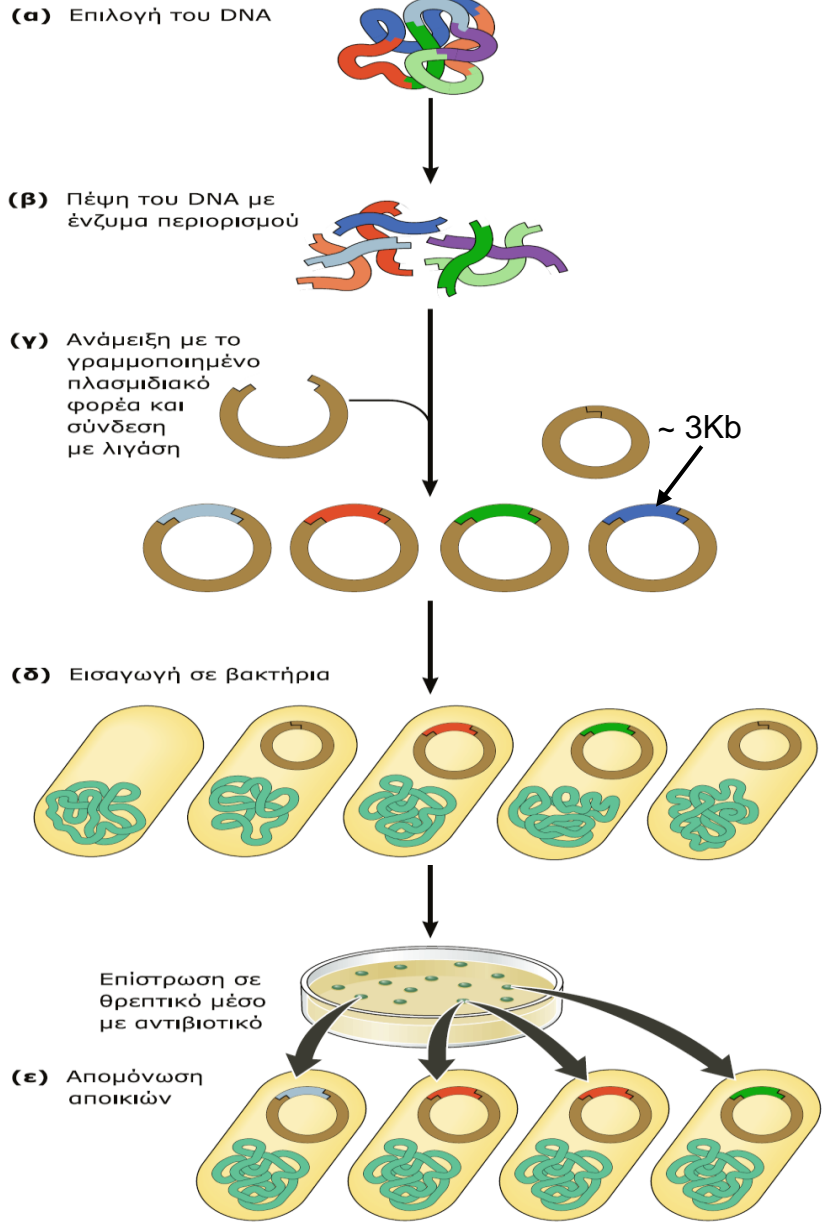
Συχνότητα μετασχηματισμού:  $10^{-4} - 10^{-5}$



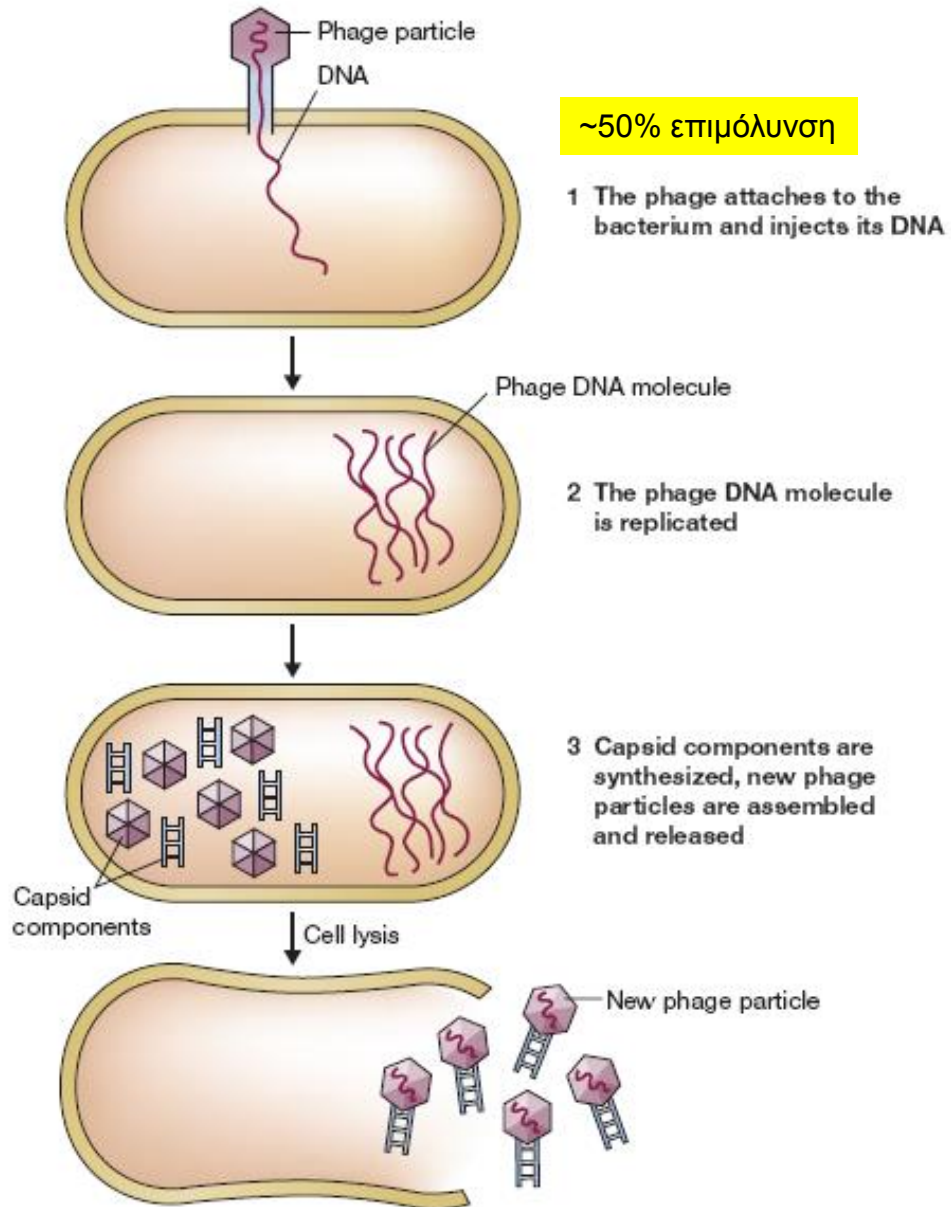
Μία αποικία *E. coli*  
 $\sim 10^6$  βακτήρια

# Κατασκευή βιβλιοθήκης σε πλασμίδια

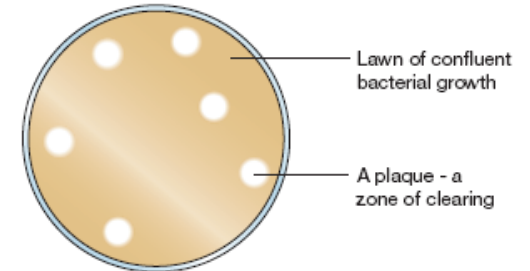
ΕΙΚΟΝΑ 4.5



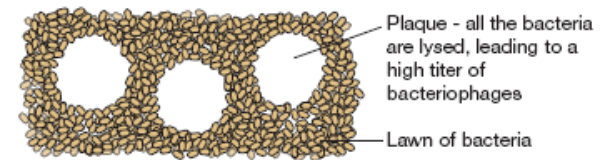
$10^6$  τμήματα ( $10^{-7}$  απόδοση)  
 $\rightarrow 10^{13}$  αποικίες  $\rightarrow 10^{10}$  τρυβλία



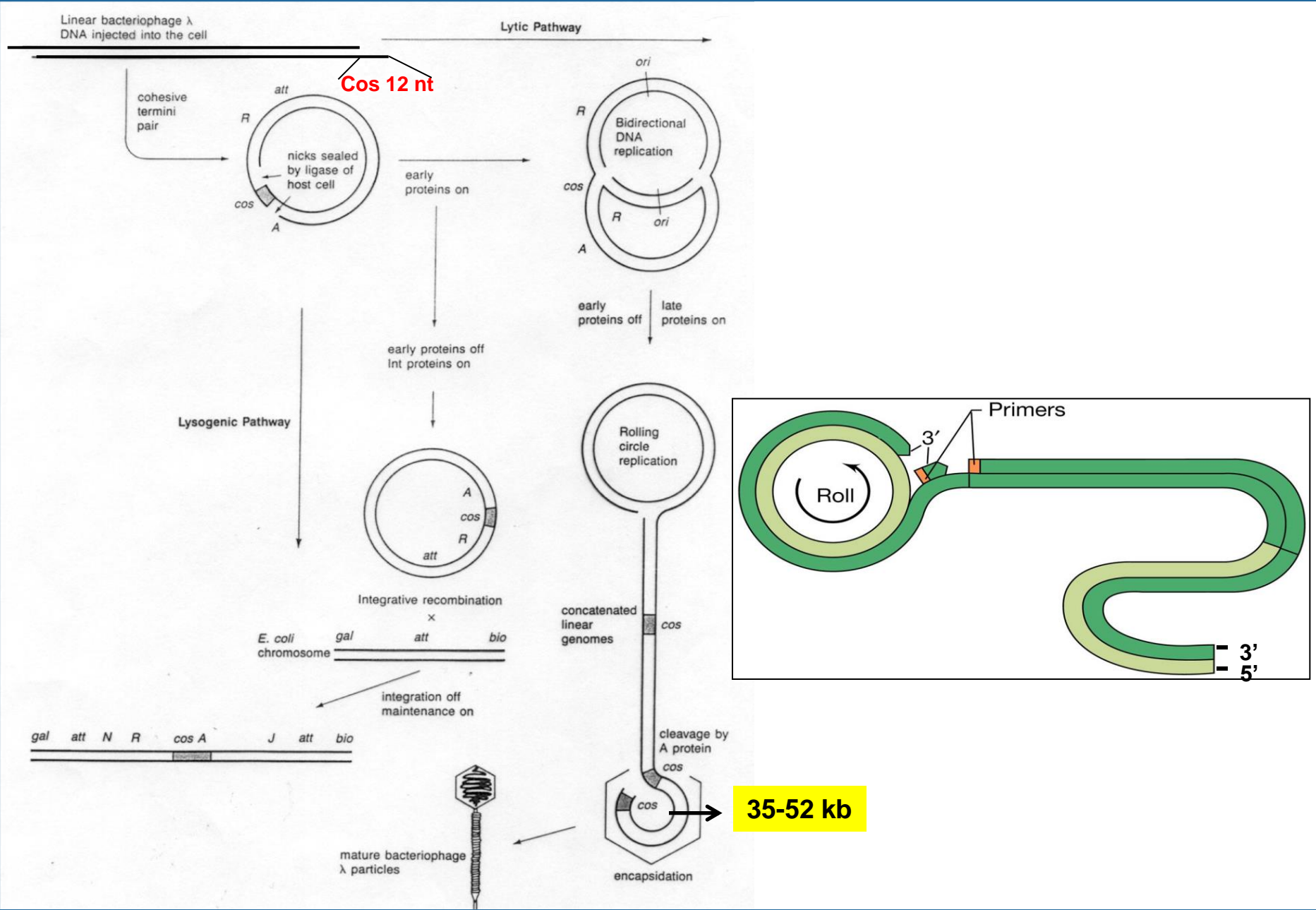
(a) Plaques on a lawn of bacteria

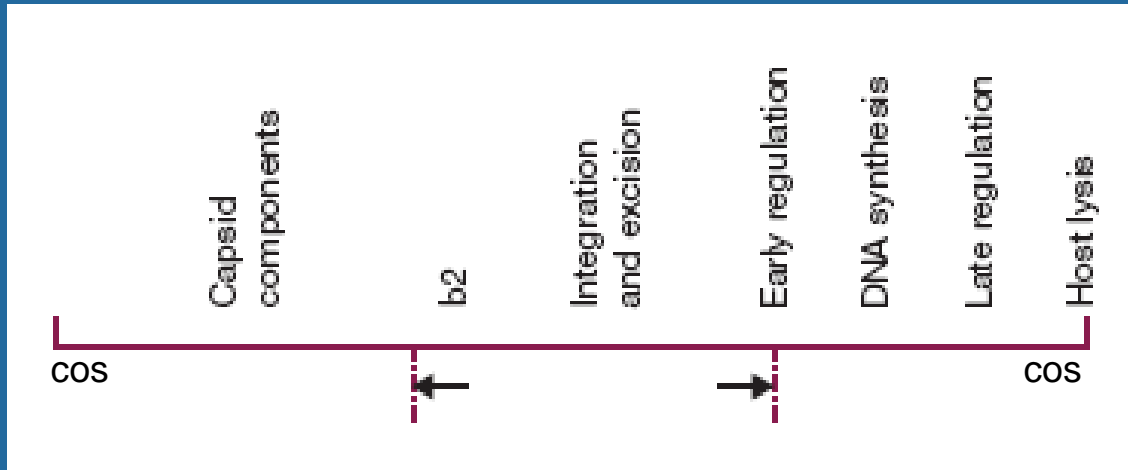


(b) Lytic plaques

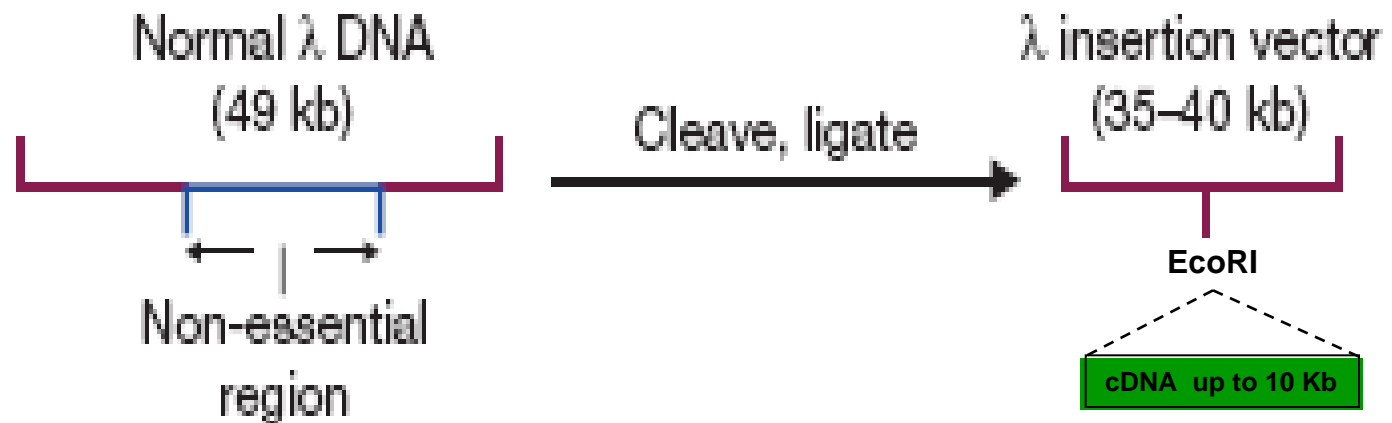


# Κύκλος του λ

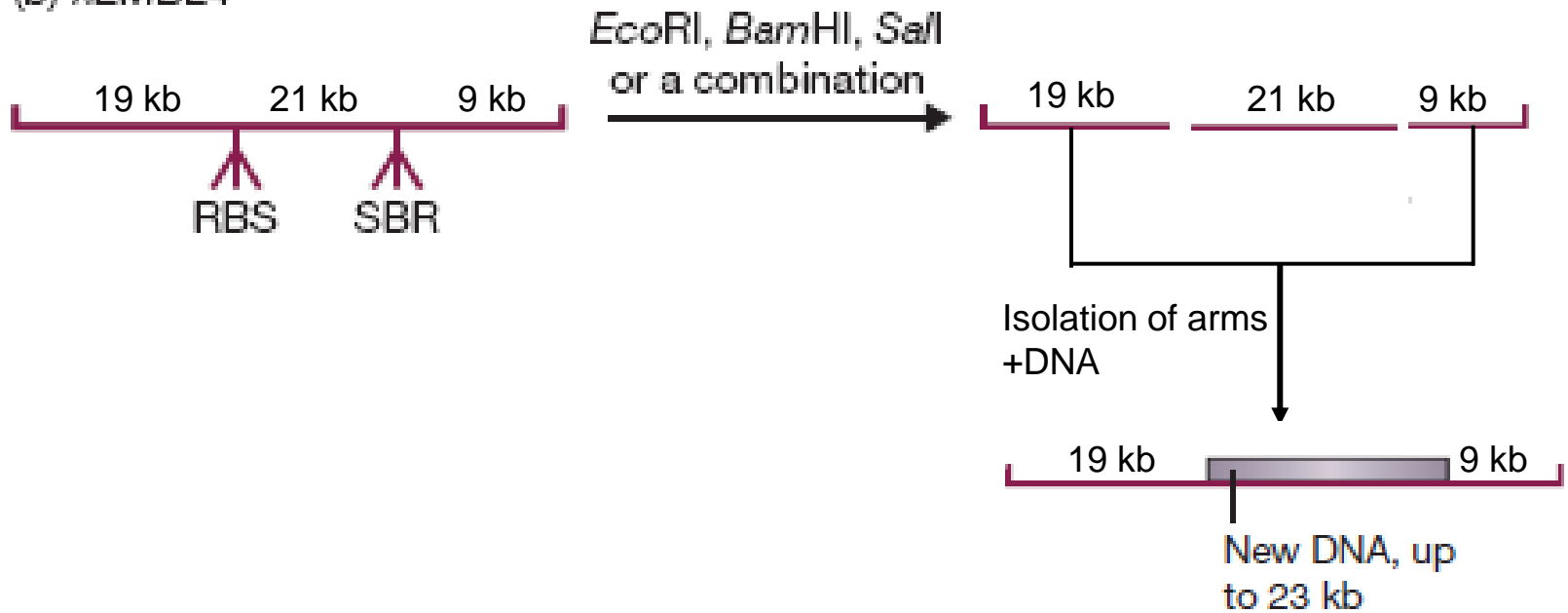




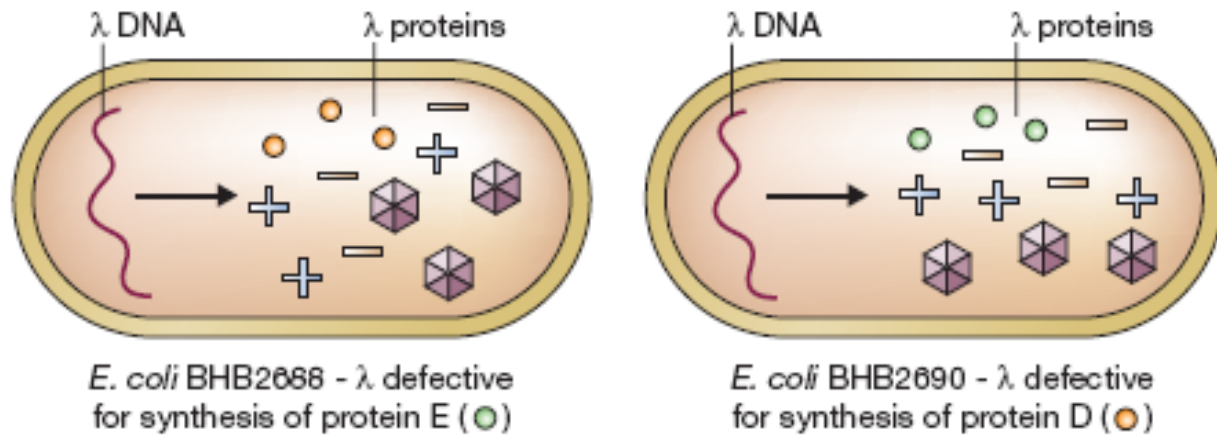
(a) Construction of a λ insertion vector



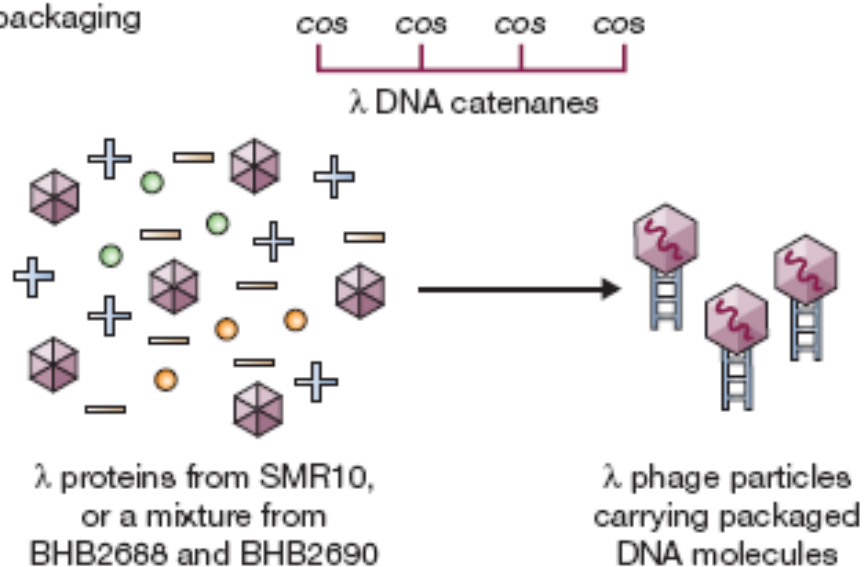
(b) λEMBL4



(b) A two-strain packaging system

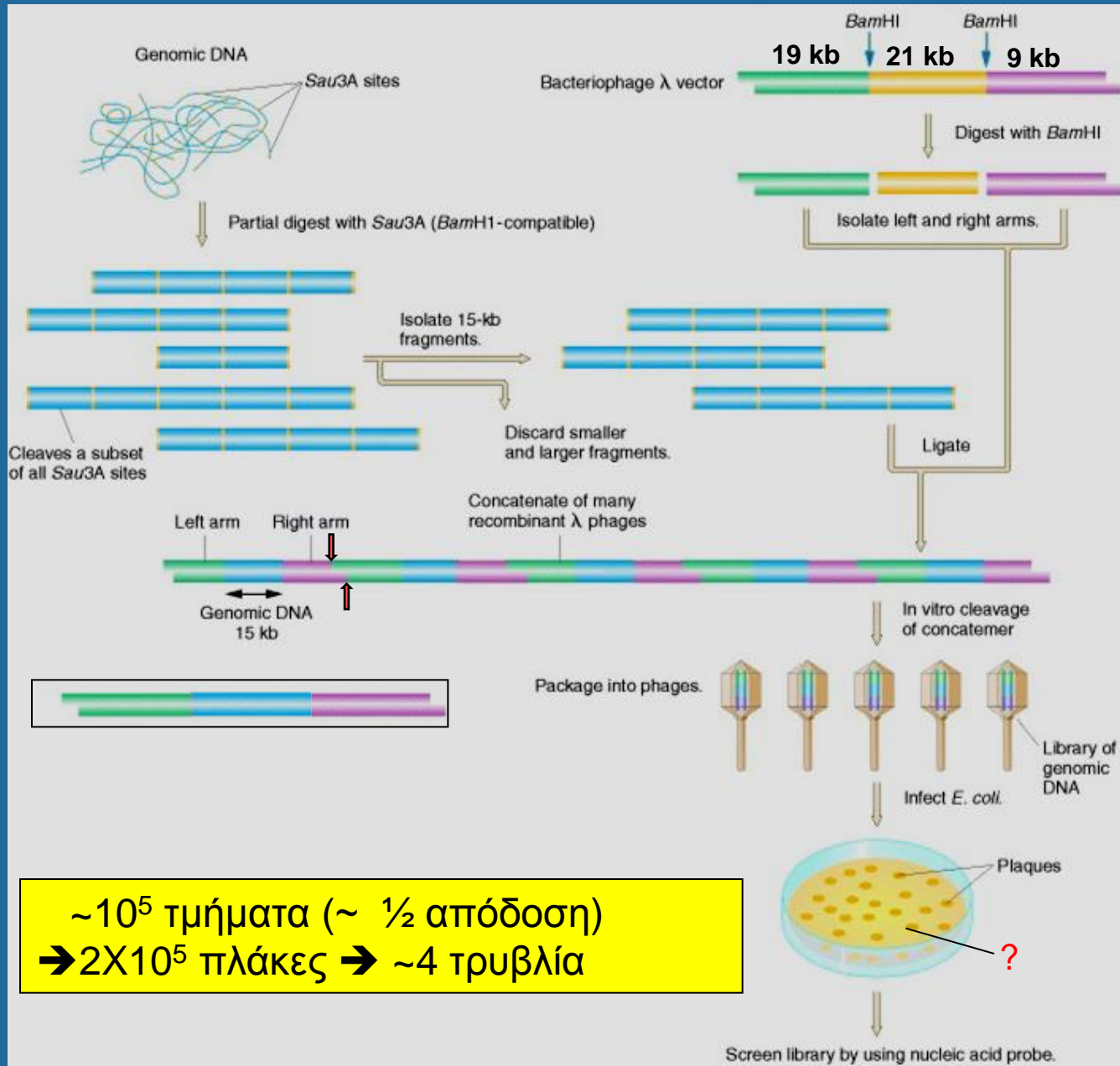


(c) *In vitro* packaging



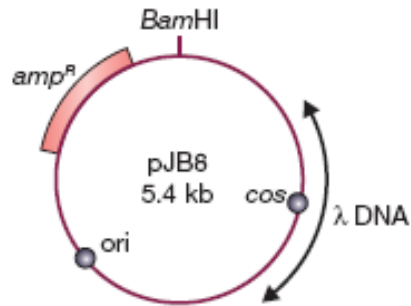


# Δημιουργία βιβλιοθήκης



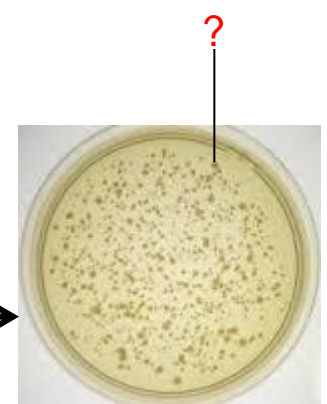
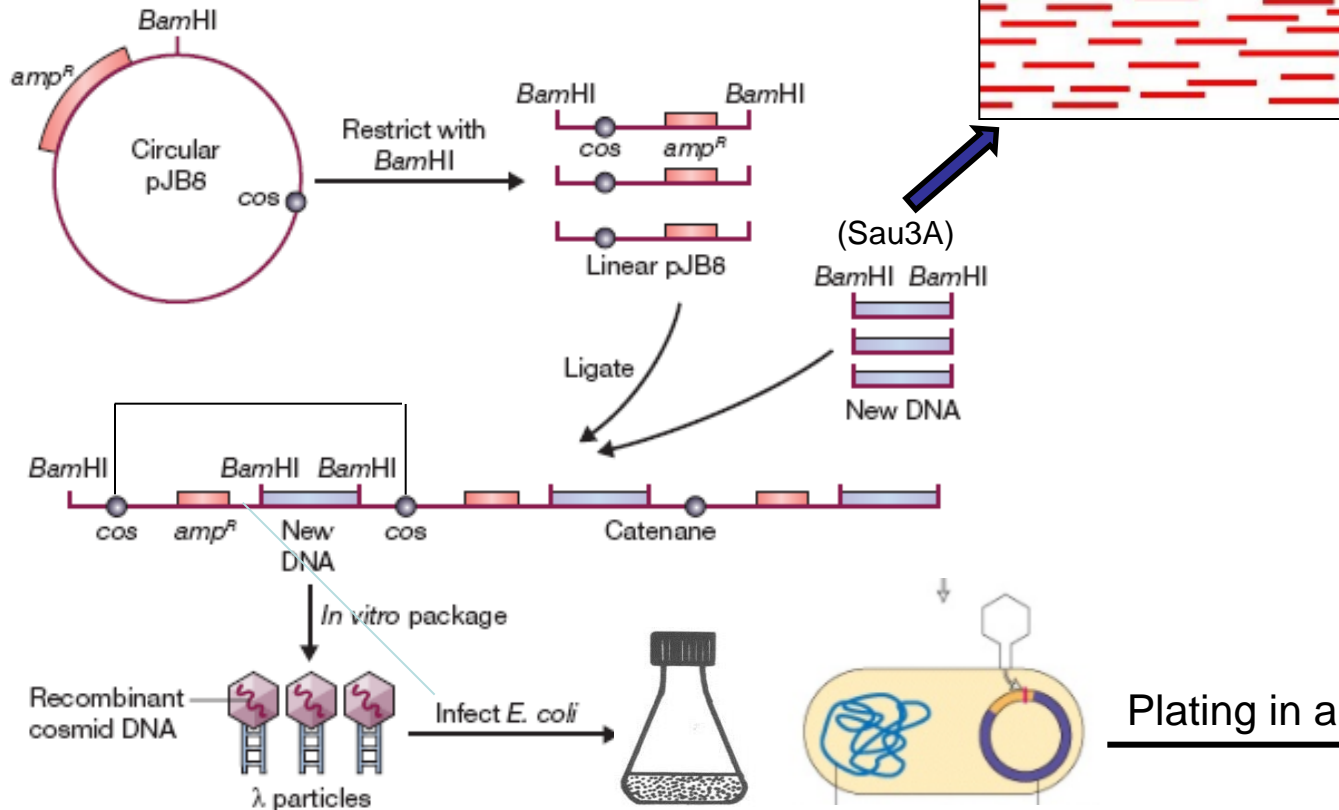
$\sim 10^5$  τμήματα ( $\sim \frac{1}{2}$  απόδοση)  
 $\rightarrow 2 \times 10^5$  πλάκες  $\rightarrow \sim 4$  τρυβλία

(a) A typical cosmid

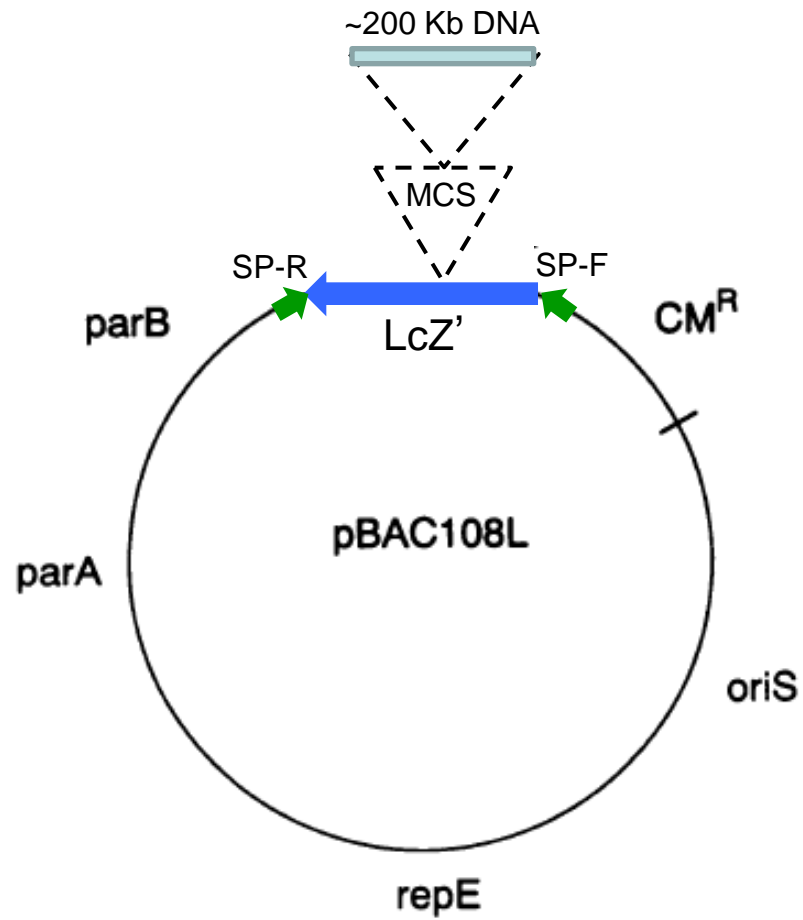


40- 45 Kb

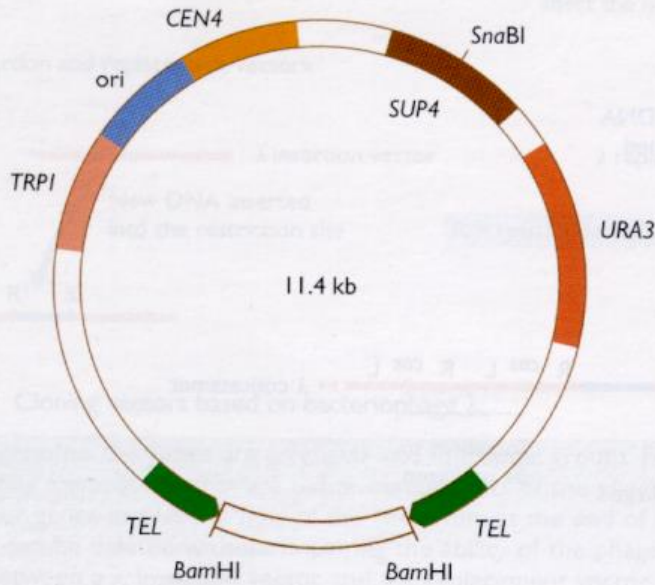
(b) Cloning with pJB6



# Κλωνοποίηση σε βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα

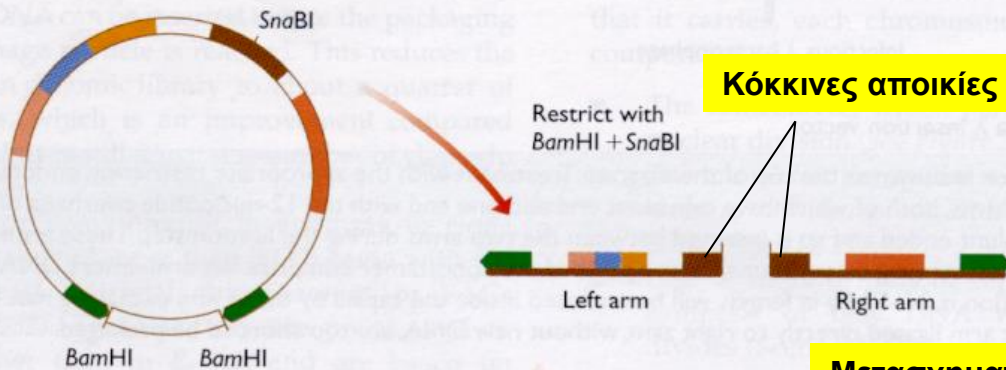


(A) pYAC3

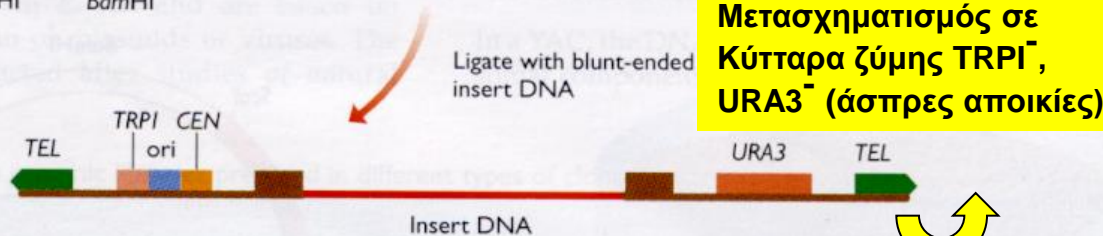


KEY	
CEN4	Centromere from yeast chromosome IV
TEL	Telomere
ori	Origin of replication
TRP1	Selectable markers
SUP4	
URA3	

(B) Cloning with pYAC3



Κόκκινες αποικίες



Μετασηματισμός σε Κύτταρα ζύμης TRP1<sup>-</sup>, URA3<sup>-</sup> (άσπρες αποικίες)

Τεχνητά χρωμοσώματα (200-2000 kb)

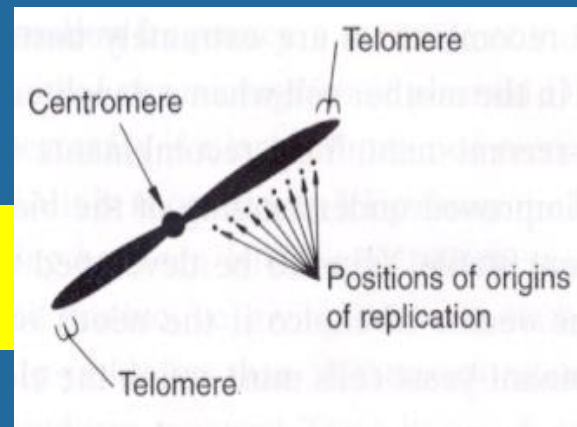
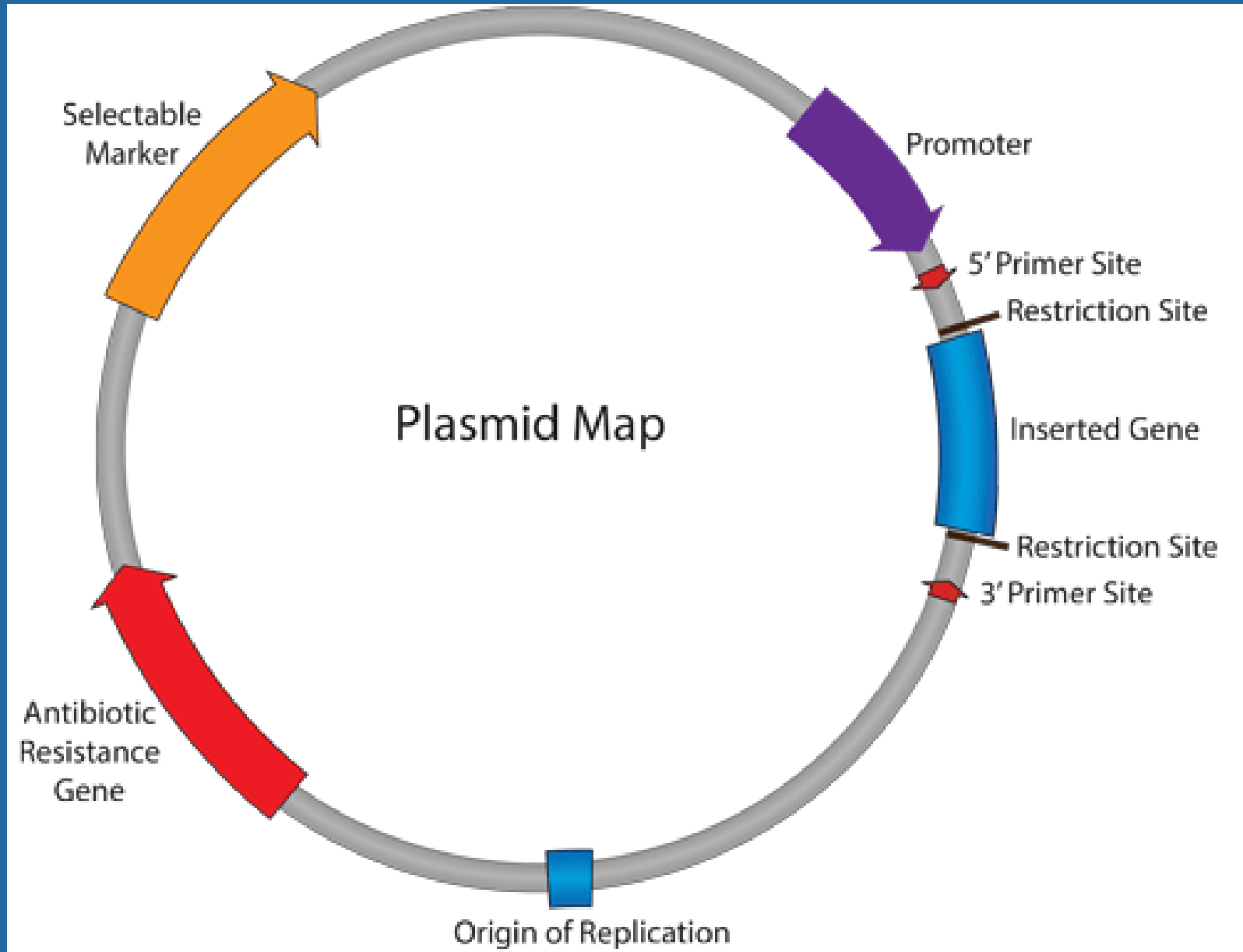


Table 6.1

Number of clones needed for genomic libraries of a variety of organisms.

SPECIES	GENOME SIZE (bp)	NUMBER OF CLONES*		
		17 kb FRAGMENTS† Lamda phage	35 kb FRAGMENTS‡ Cosmids	200 Kb FRAGMENTS BAC plasmids
<i>E. coli</i>	$4.6 \times 10^8$	(235)	(114)	(20)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1.8 \times 10^7$			
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1.2 \times 10^8$			
Rice	$5.7 \times 10^8$			
Human	$3.2 \times 10^9$	(~100.000)	(60.000)	(15.000)
Frog	$2.3 \times 10^{10}$			

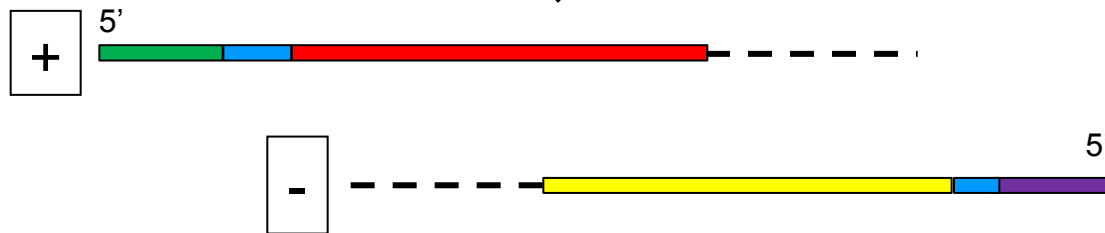
# Αλληλούχιση DNA



# Αλληλούχιση DNA



↓ DNA polymerase



- plasmid
- + strand
- strand
- F primer
- R primer

# Αλληλούχιση DNA Μέθοδος Sanger

EΙΚΟΝΑ 4.12

(a)

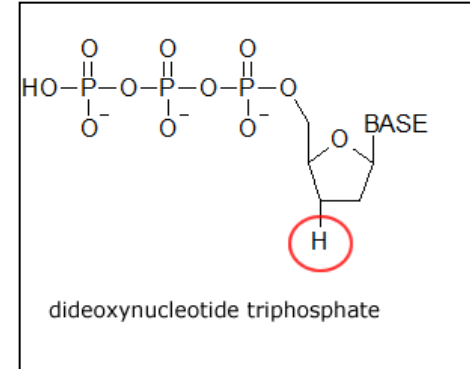
Δίκλωνο  
DNA



Δημιουργία μονόκλωνης  
μήτρας



Πραγματοποίηση τεσσάρων  
αντιδράσεων



Νουκλεοτιδιο

**A**

Μείγμα νου-  
κλεοτιδίων

dATP  
dTTP  
**ddTTP**  
dGTP  
dCTP  
dATP★



Προσθήκη DNA  
πολυμεράσης

**T**

dATP  
**ddATP**  
dTTP  
dGTP  
dCTP  
dATP★



**G**

dATP  
dTTP  
dGTP  
dCTP  
**ddCTP**  
dATP★

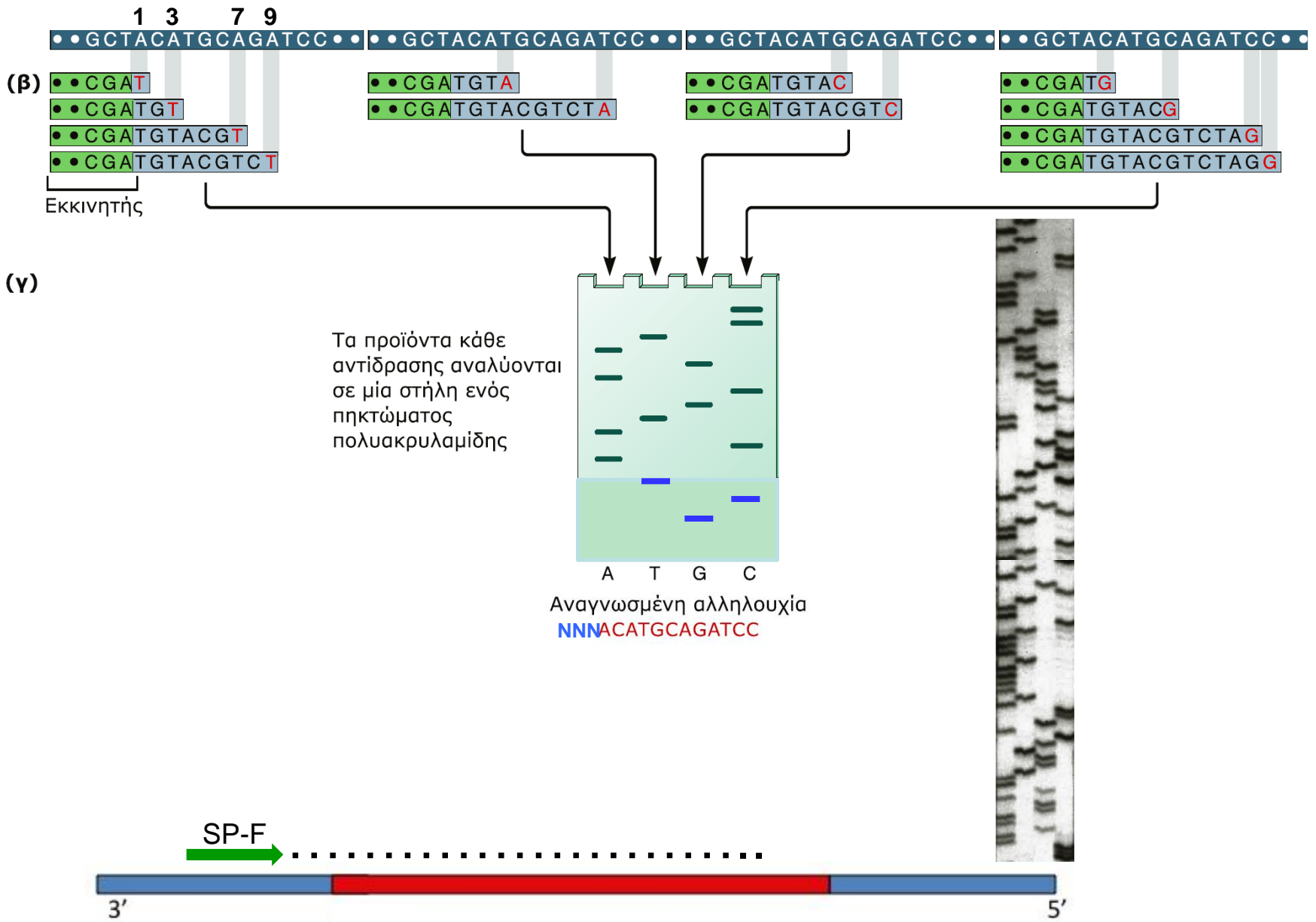


**C**

dATP  
dTTP  
dGTP  
**ddGTP**  
dCTP  
dATP★

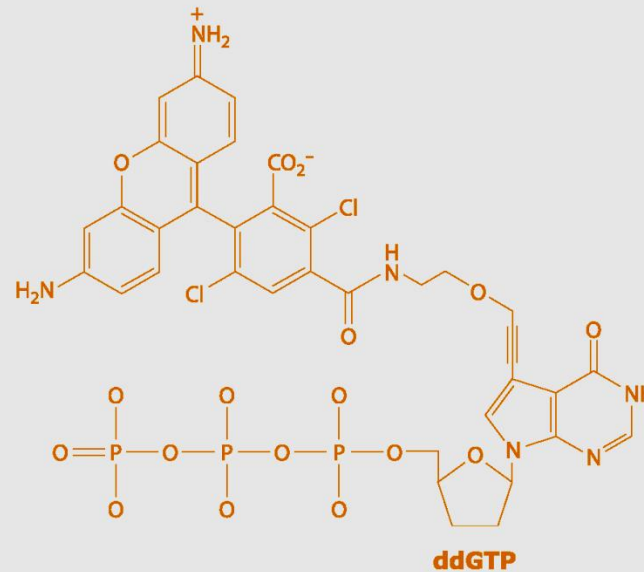
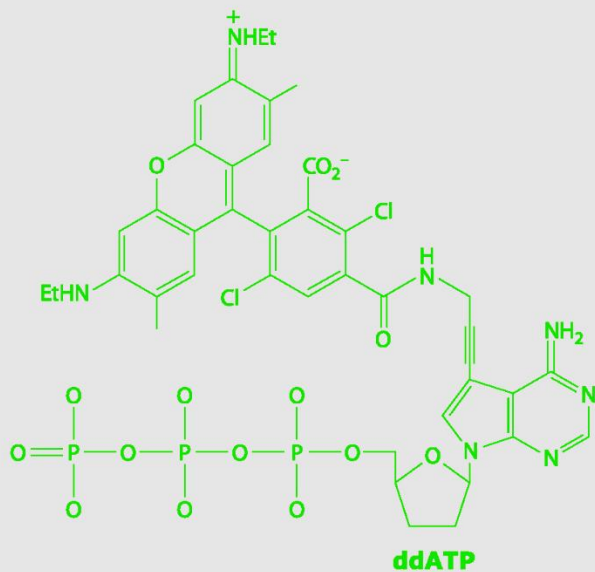
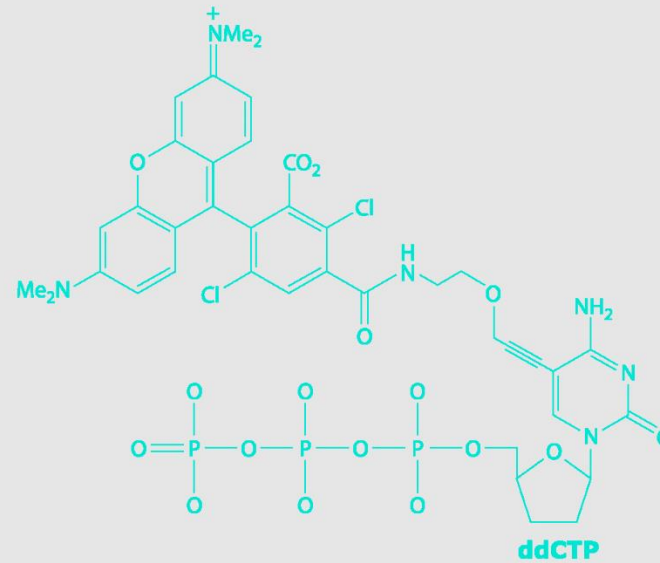
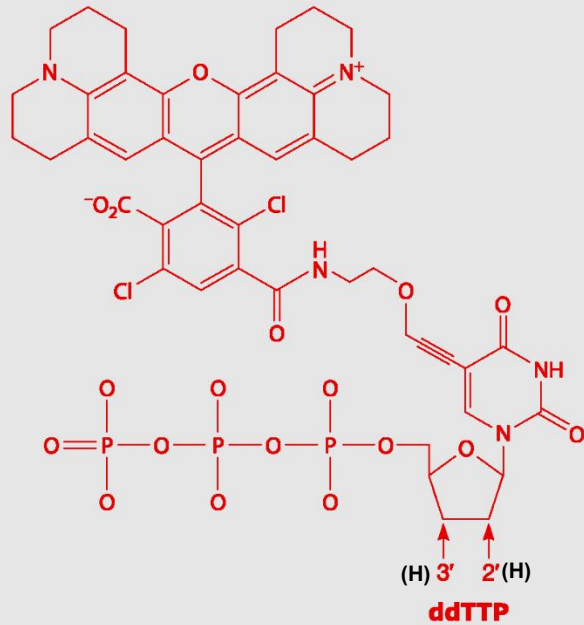






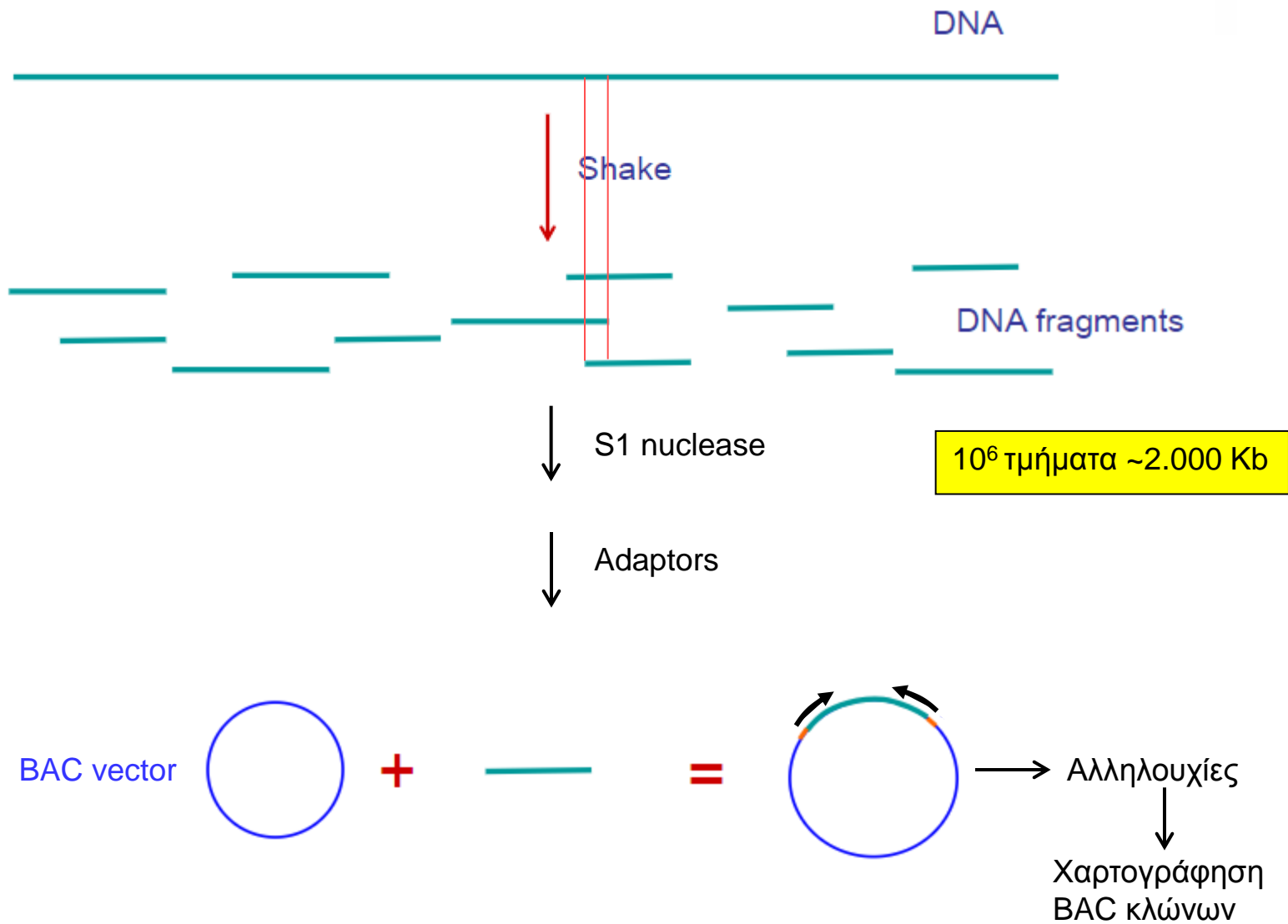
# Δομές διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP) σημασμένων με φθορίζουσες χημικές ομάδες.

ΕΙΚΟΝΑ 10.10



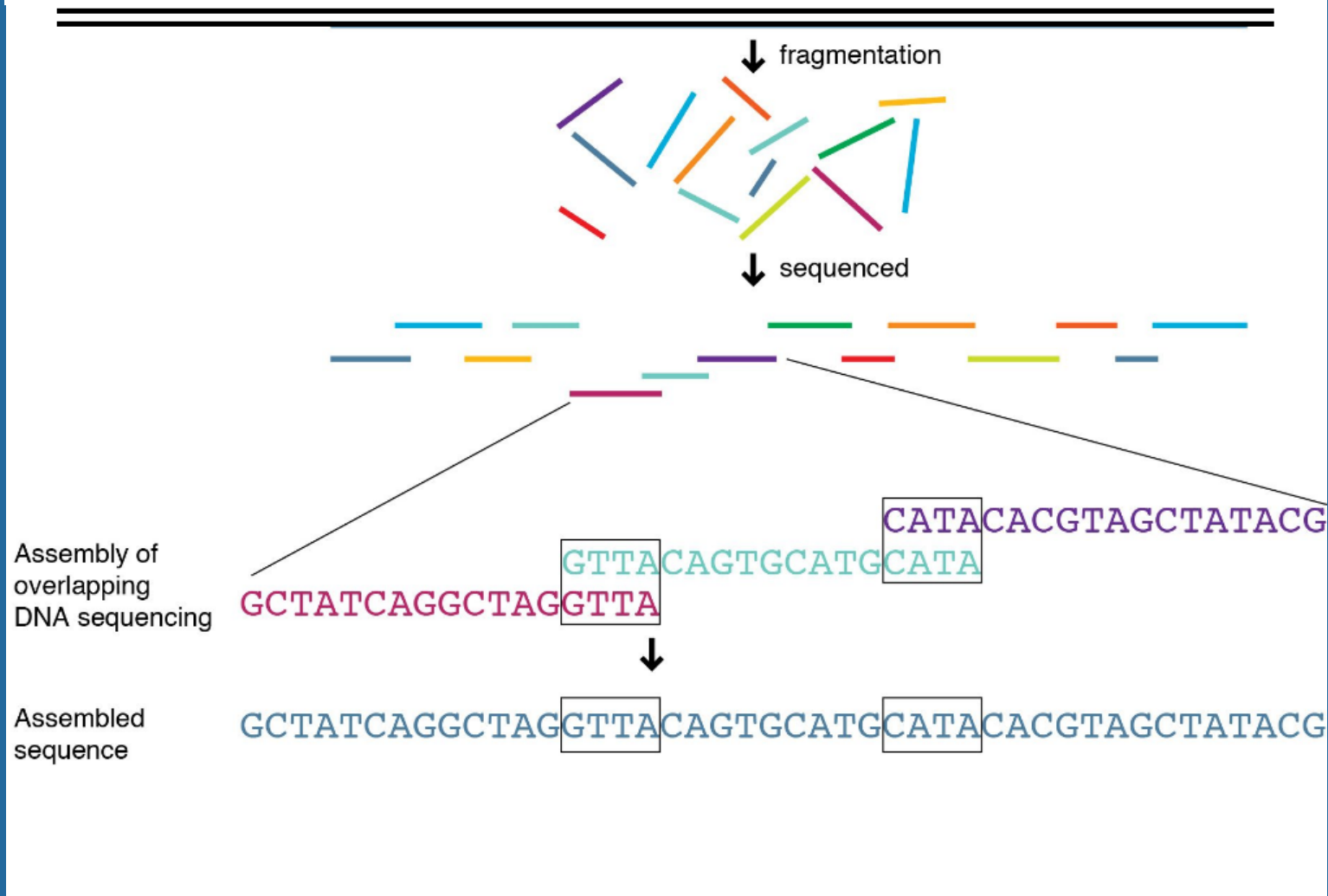


# Κλωνοποίηση σε βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα (BACs)

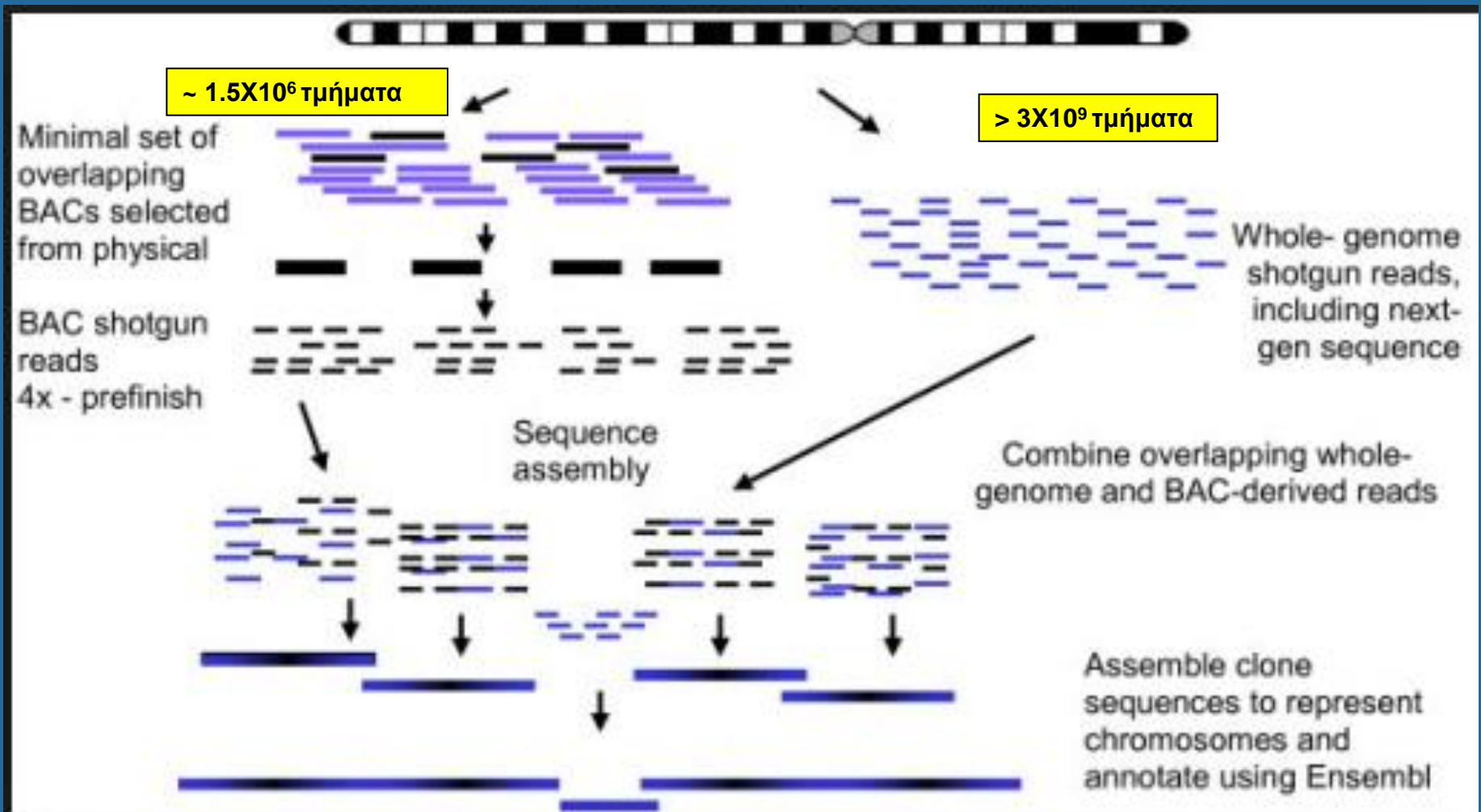


# Αλληλούχιση και χαρτογράφηση γονιδιωμάτων

## Large DNA ή γονίδιομα (Shotgun sequencing)

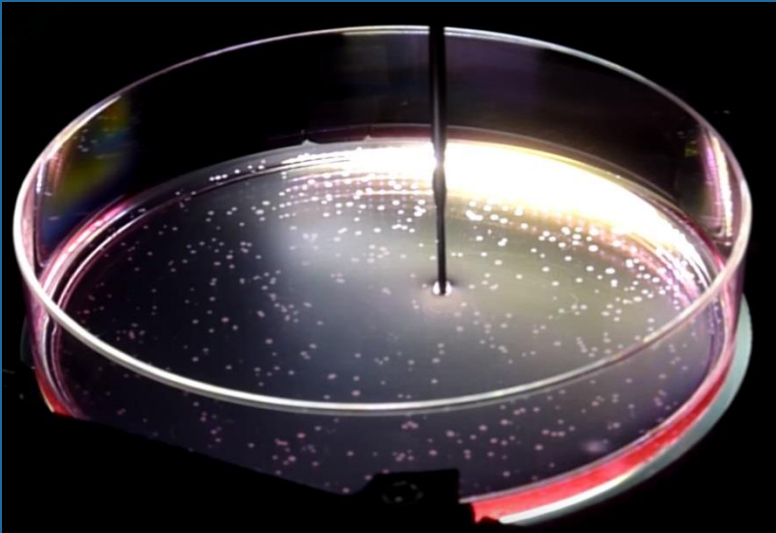


# Συνδιασμένη αλληλούχηση

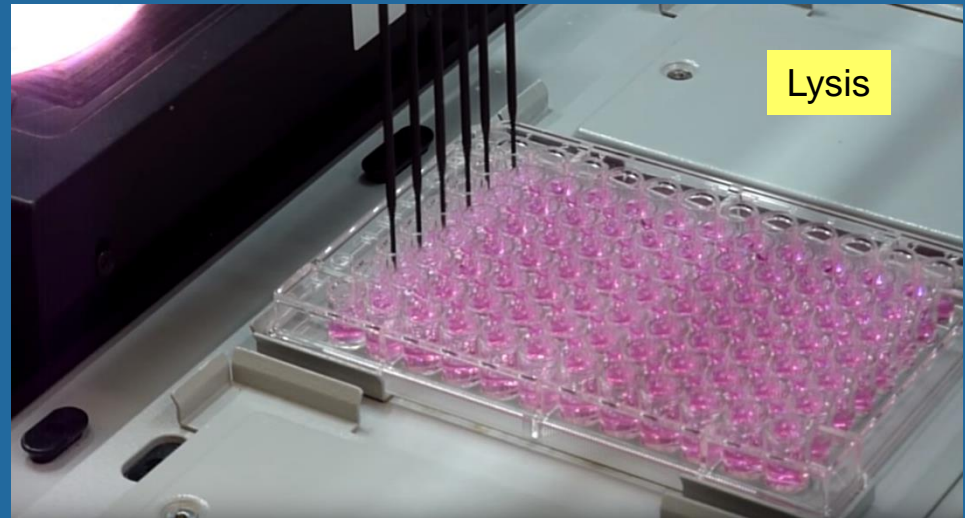


# Ρομποτική στην αλληλούχιση γονιδιωμάτων

Petri dish



Microtiter plate

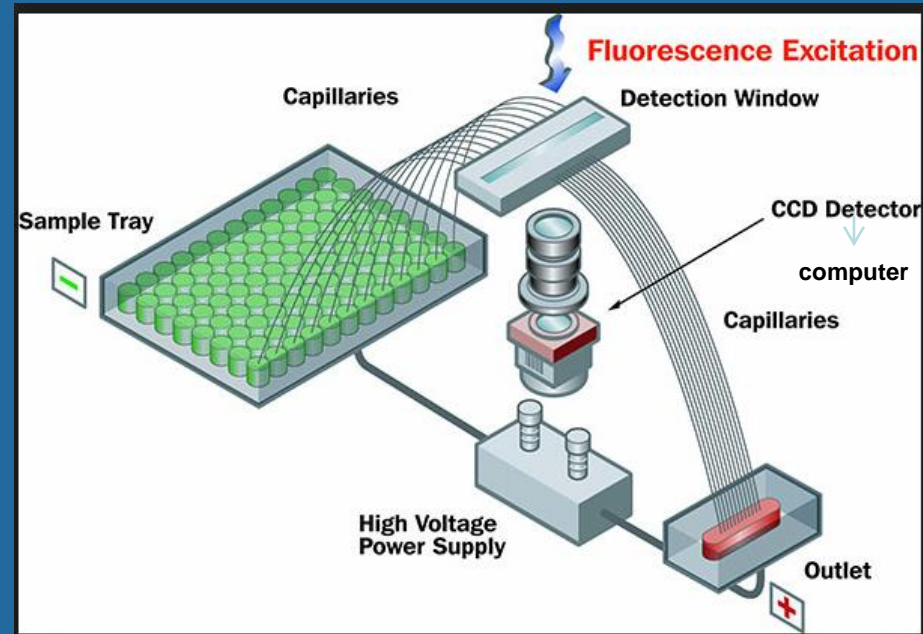
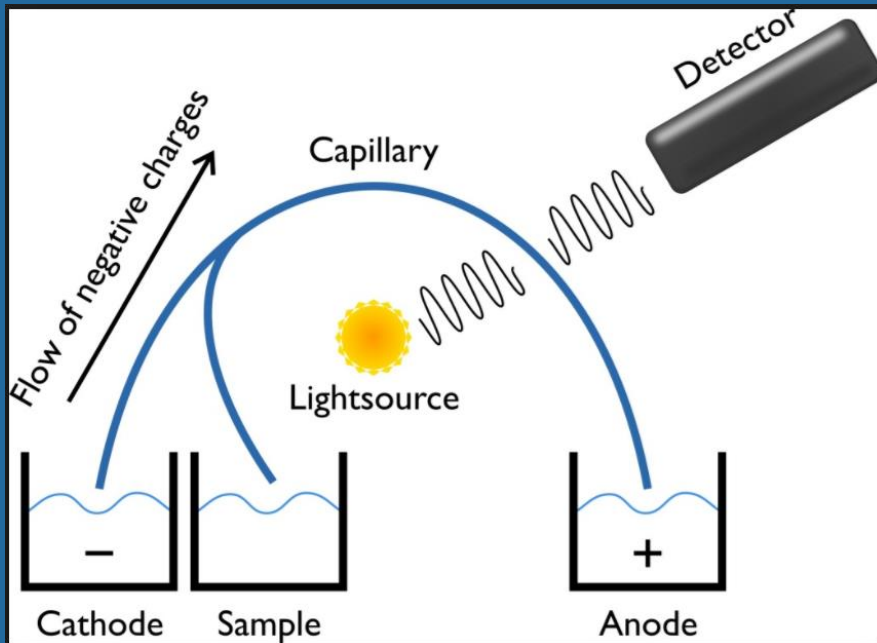




# Second-generation sequencing

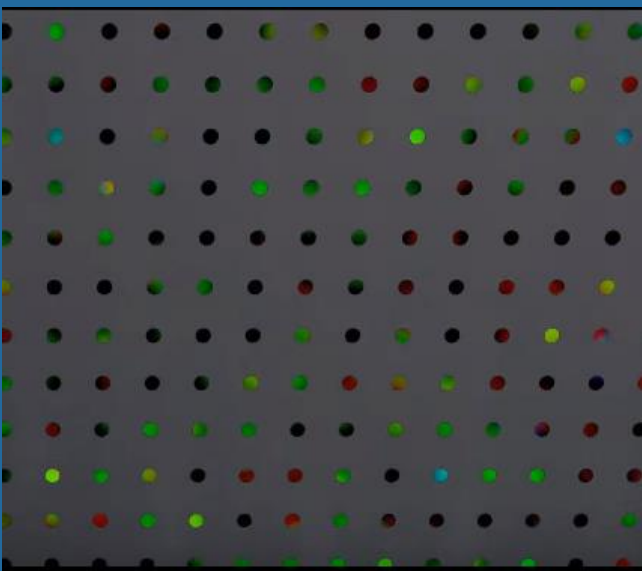
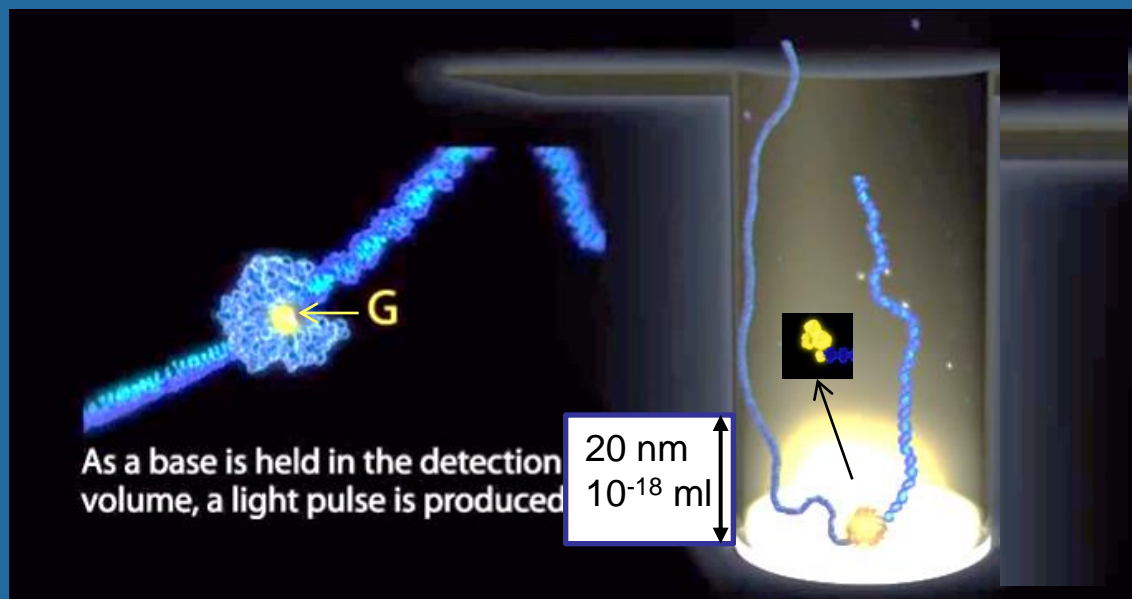
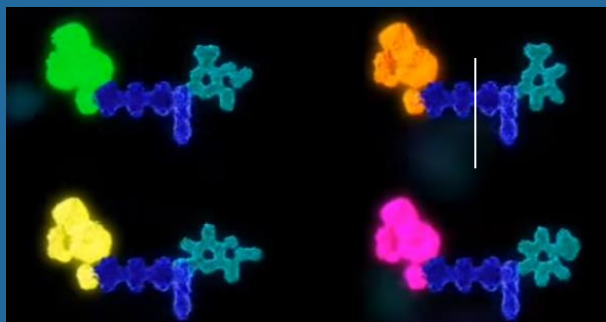
DNA isolation

Sequencing reactions



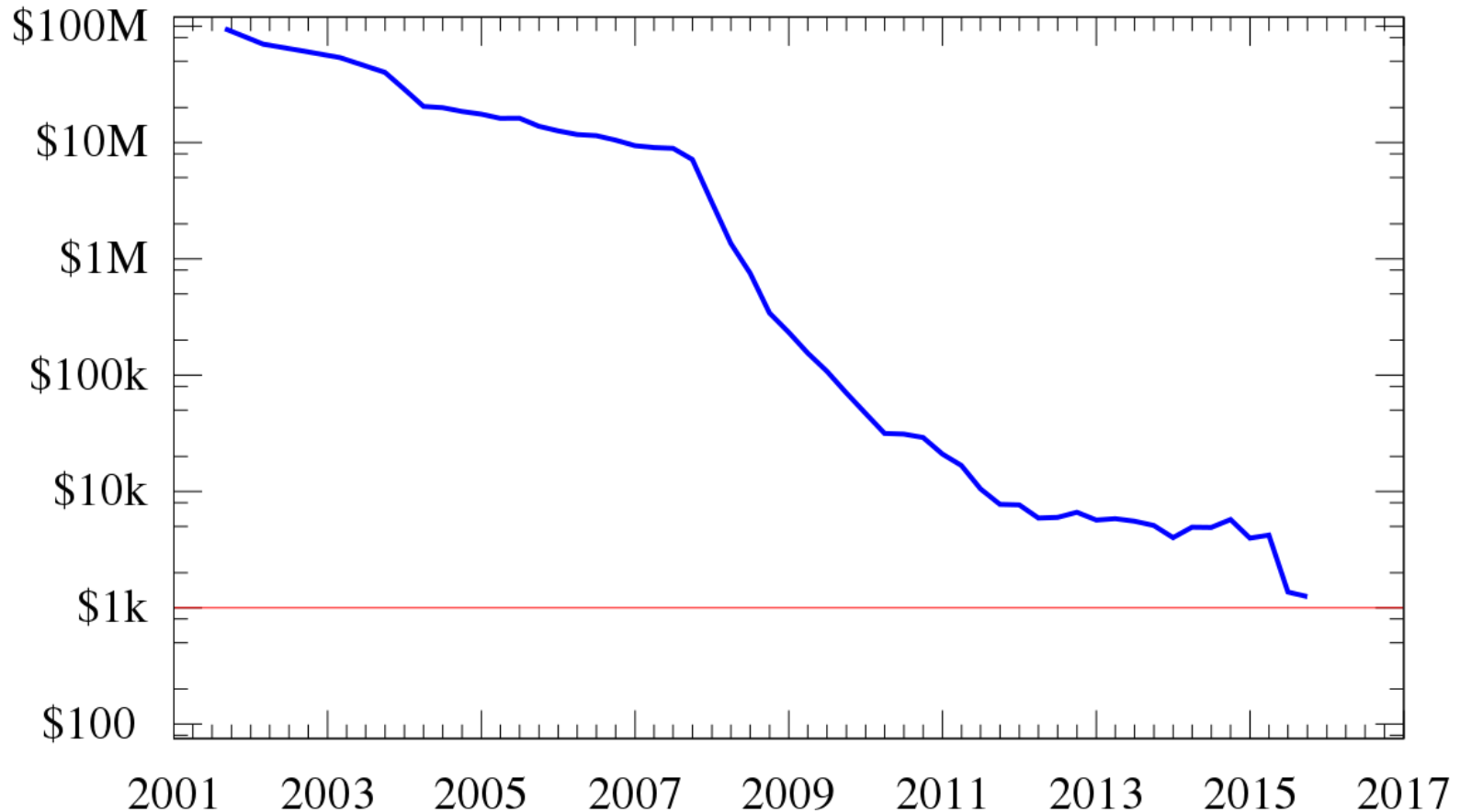


## Second-generation sequencing



← Χιλιάδες τμήματα DNA των 6 kb σε 6 λεπτά =>  
Αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος  
σε μερικά λεπτά

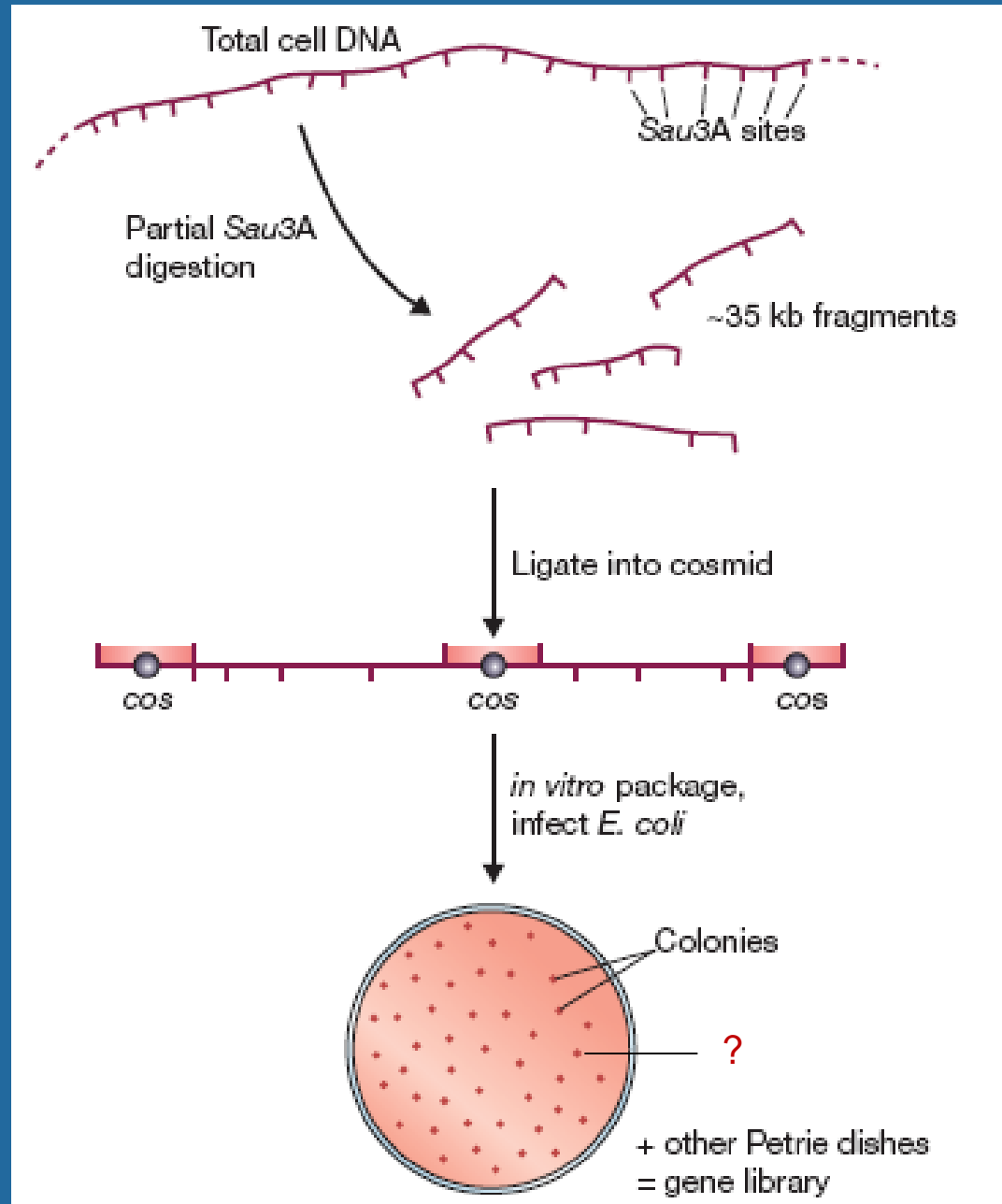
## Cost to sequence a human genome (USD)



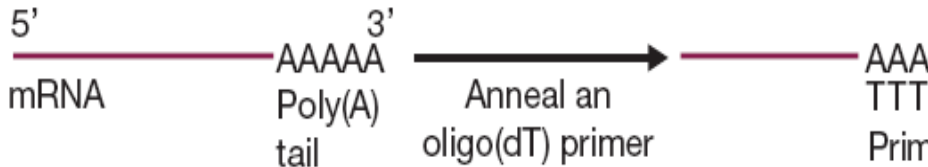
~ 10 χρόνια

~ 365 φορές μείωση στο χρόνο  
~1 εκατ. φορές μείωση στο κόστος

~ μέρες



(a) First strand synthesis



Reverse transcriptase

(b) RNA degradation



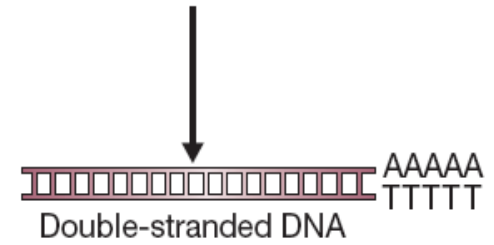
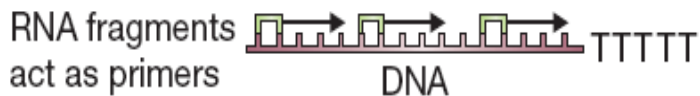
RNase HI

RNA fragments

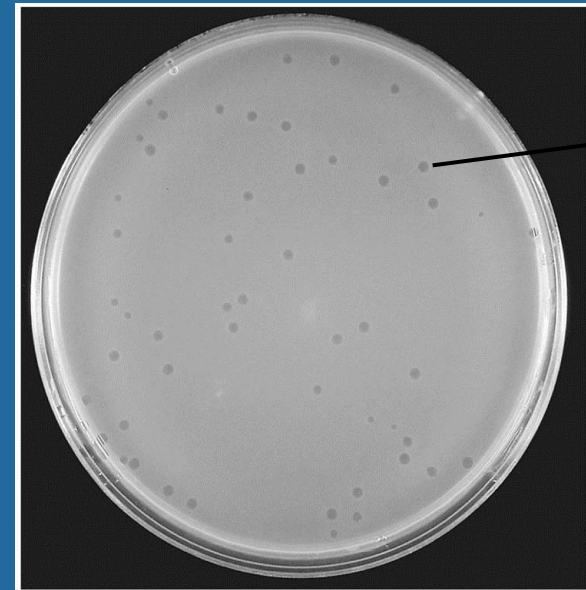


DNA pol I

(c) Second strand synthesis

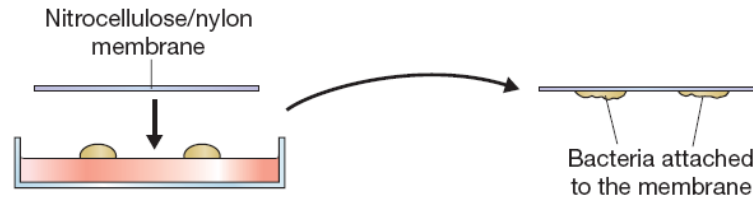


Κλωνοποίηση σε λ

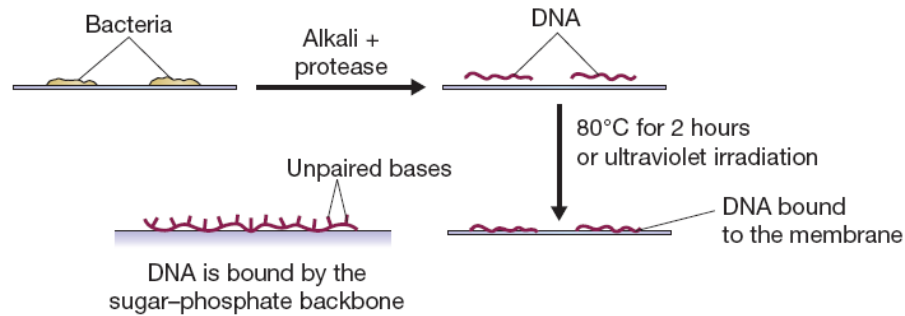


Πλάκα

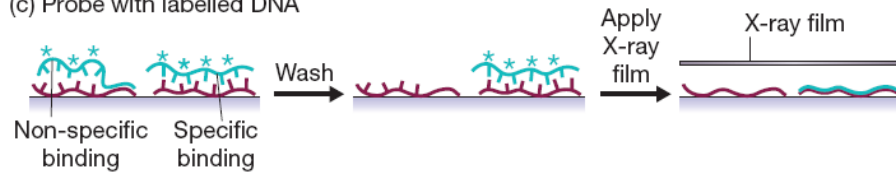
(a) Transfer colonies to nitrocellulose or nylon



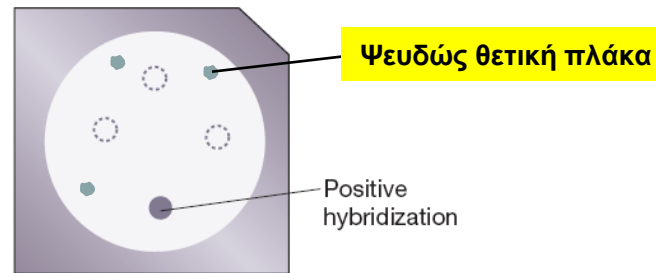
(b) Degrade cells, purify DNA

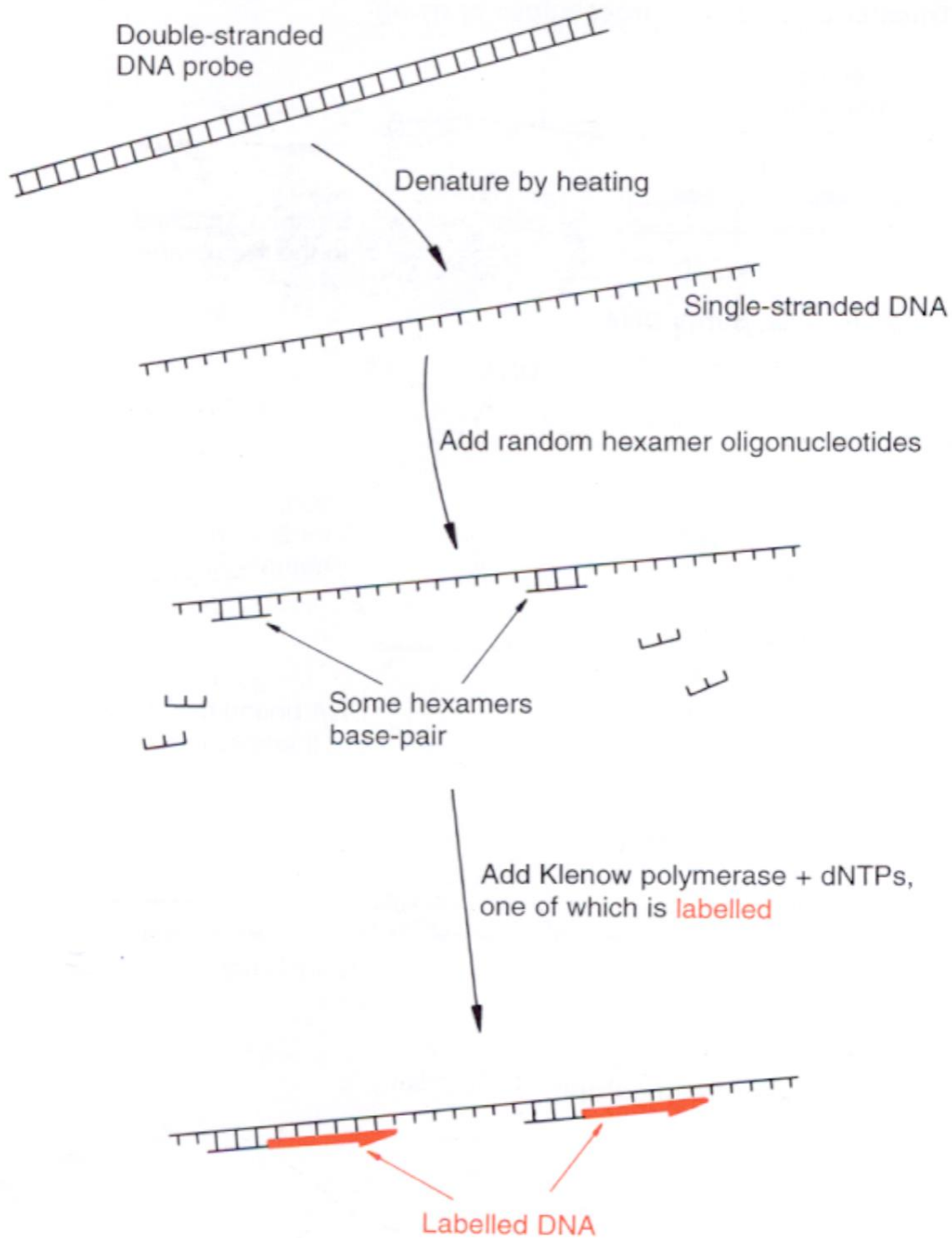


(c) Probe with labelled DNA



(d) The resulting autoradiograph





Σήμανση DNA - Ιχνηθέτης



# Εκφυλισμένα ολιγονουκλεοτίδια

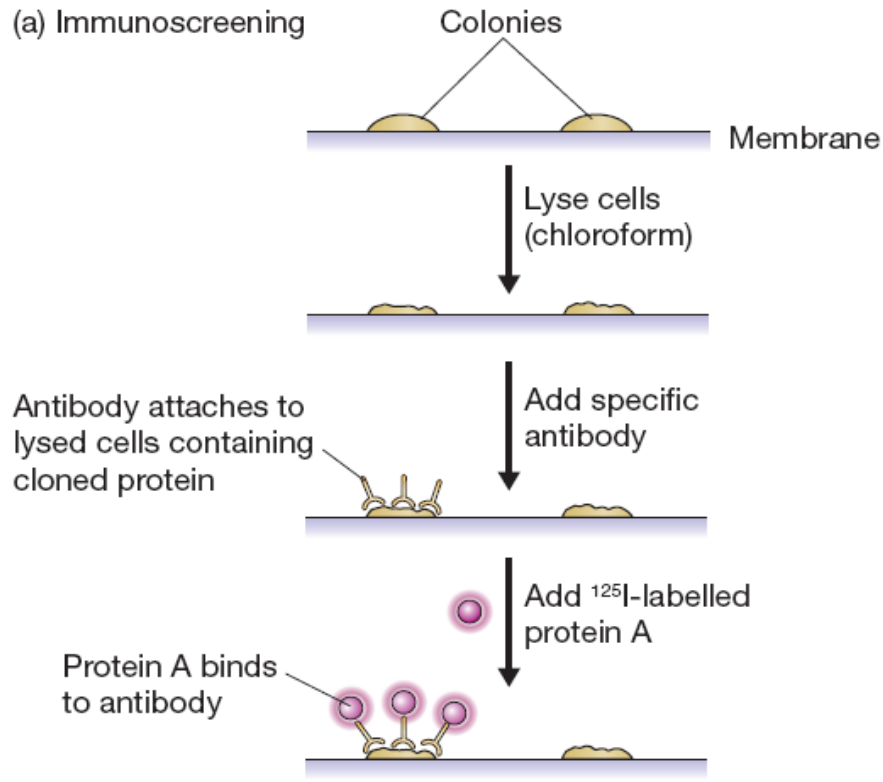
F- 8.14

GLY-SER-ALA-LYS-LYS-GLY-ALA-THR-LEU-PHE-LYS-THR-ARG-CYS-GLU-15  
LEU-CYS-HIS-THR-VAL-GLU-LYS-GLY-GLY-PRO-HIS-LYS-VAL-GLY-PRO-30  
ASN-LEU-HIS-GLY-ILE-PHE-GLY-ARG-HIS-SER-GLY-GLN-ALA-GLN-GLY-45  
TYR-SER-TYR-THR-ASP-ALA-ASN-ILE-LYS-LYS-ASN-VAL-LEU-TRP-ASP-60  
GLU-ASN-ASN-MET-SER-GLU-TYR-LEU-THR-ASN-PRO-LYS-LYS-TYR-ILE-75  
PRO-GLY-THR-LYS-MET-ALA-PHE-GLY-GLY-LEU-LYS-LYS-GLU-LYS-ASP-90  
ARG-ASN-ASP-LEU-ILE-THR-TYR-LEU-LYS-LYS-ALA-CYS-GLU<sup>103</sup>

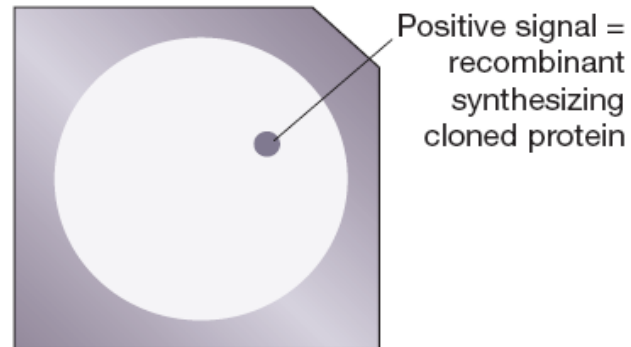


# Επιλογή κλώνων με αντισώματα Βιβλιοθήκες έκφρασης

(a) Immunoscreening



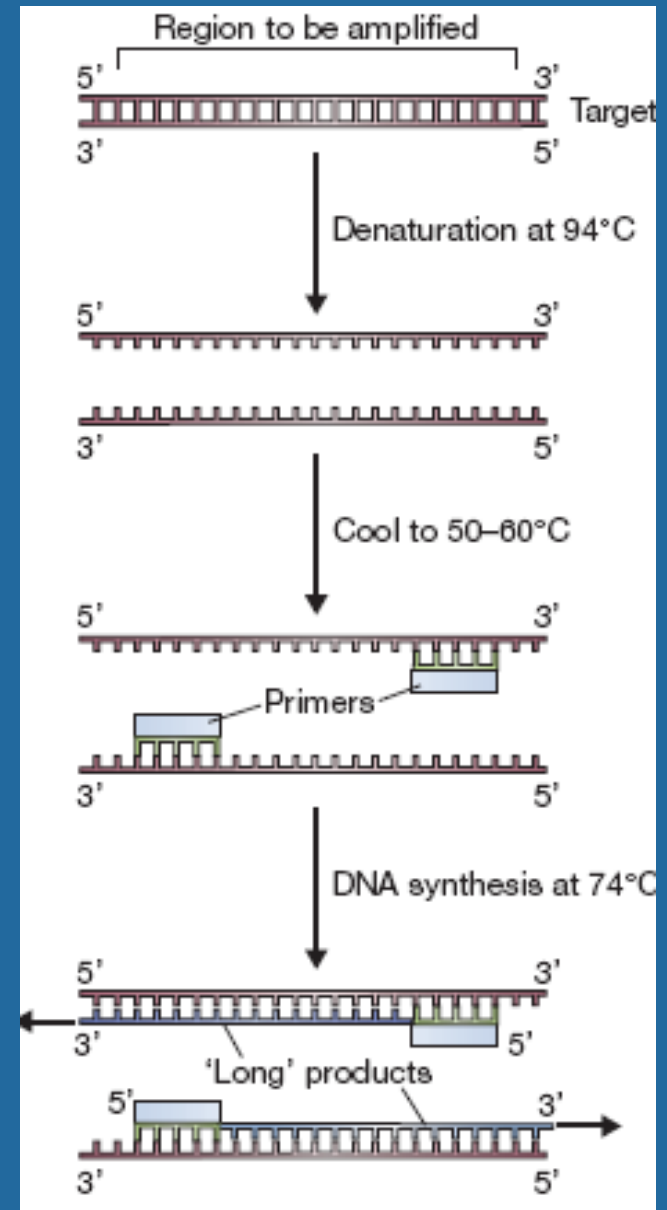
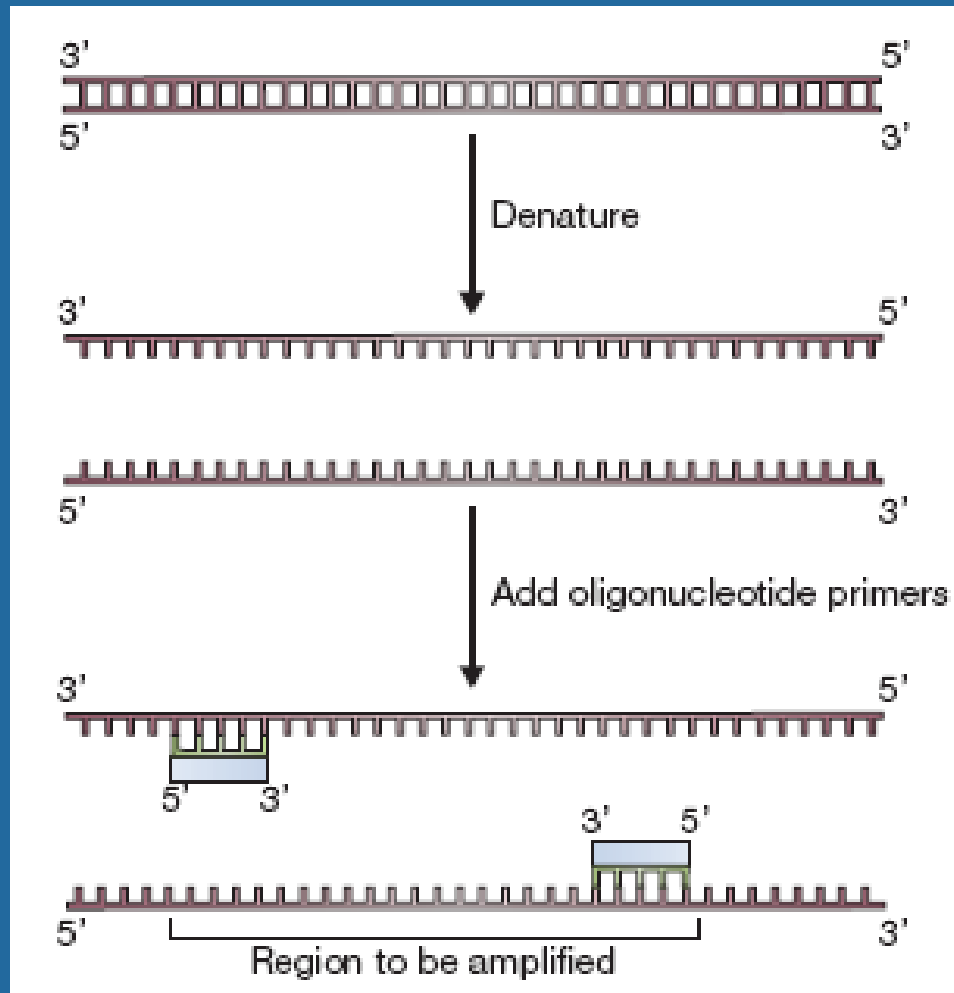
(b) The resulting autoradiograph



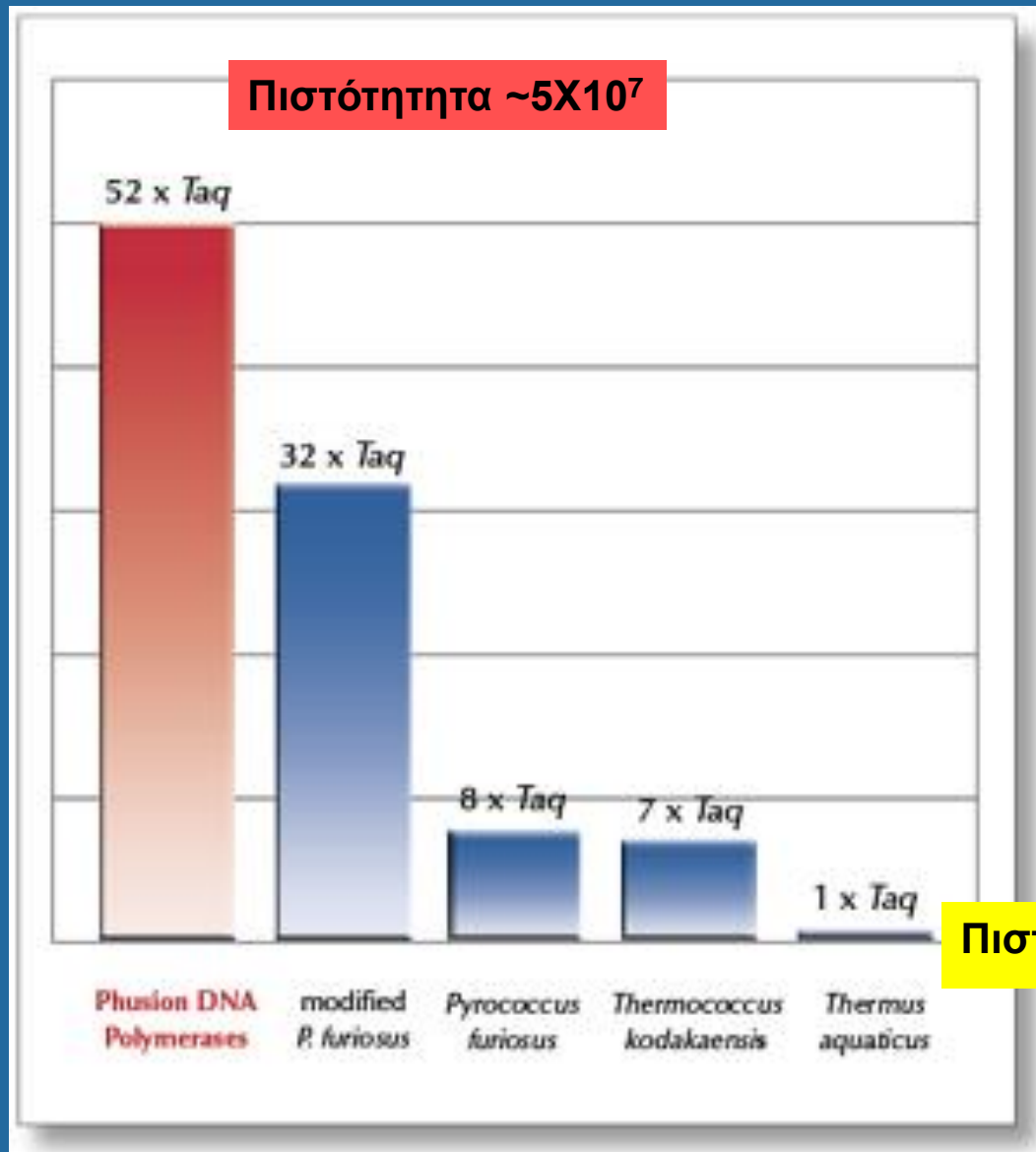
# Τεχνική PCR

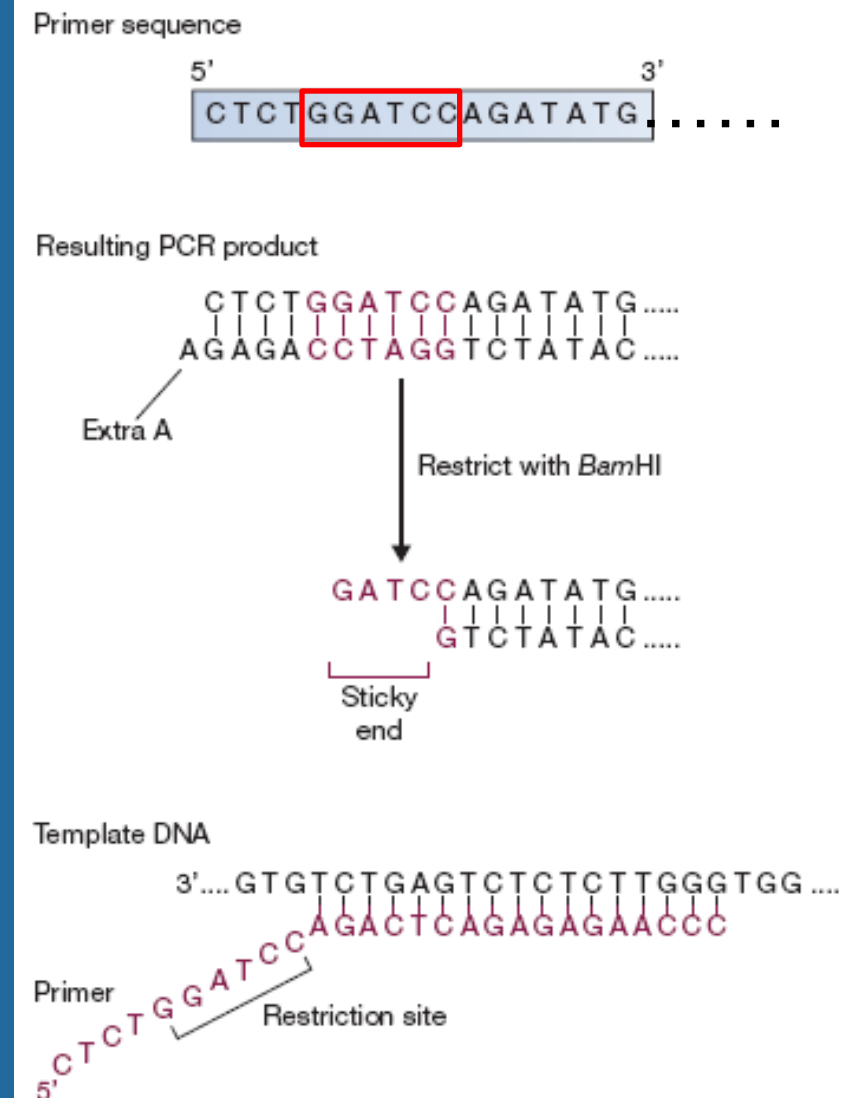
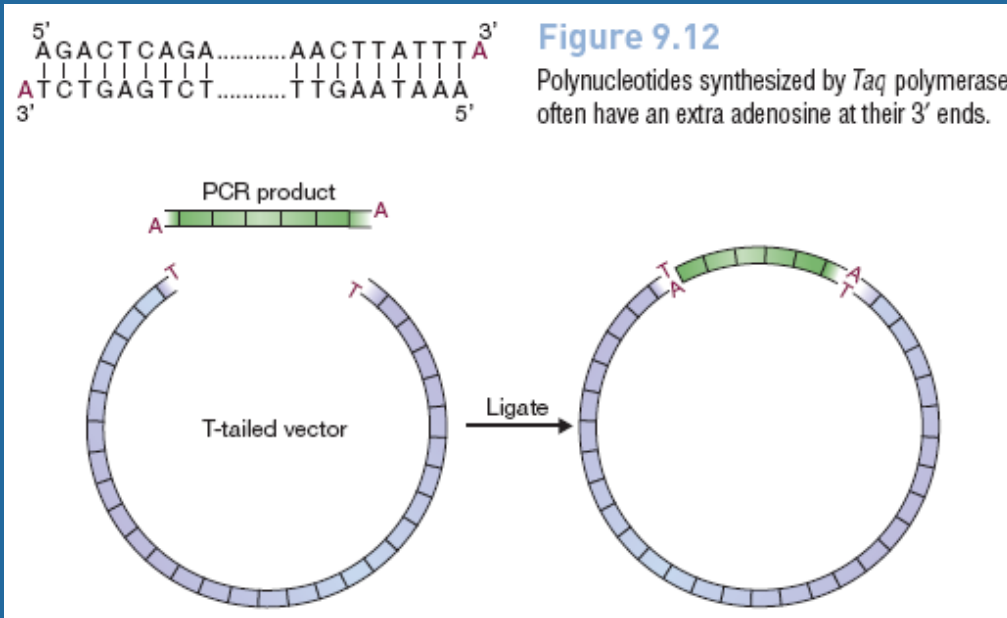
Fig.- 9.1, 9.2

EIKONA 4.15



# PCR Πολυμεράσες



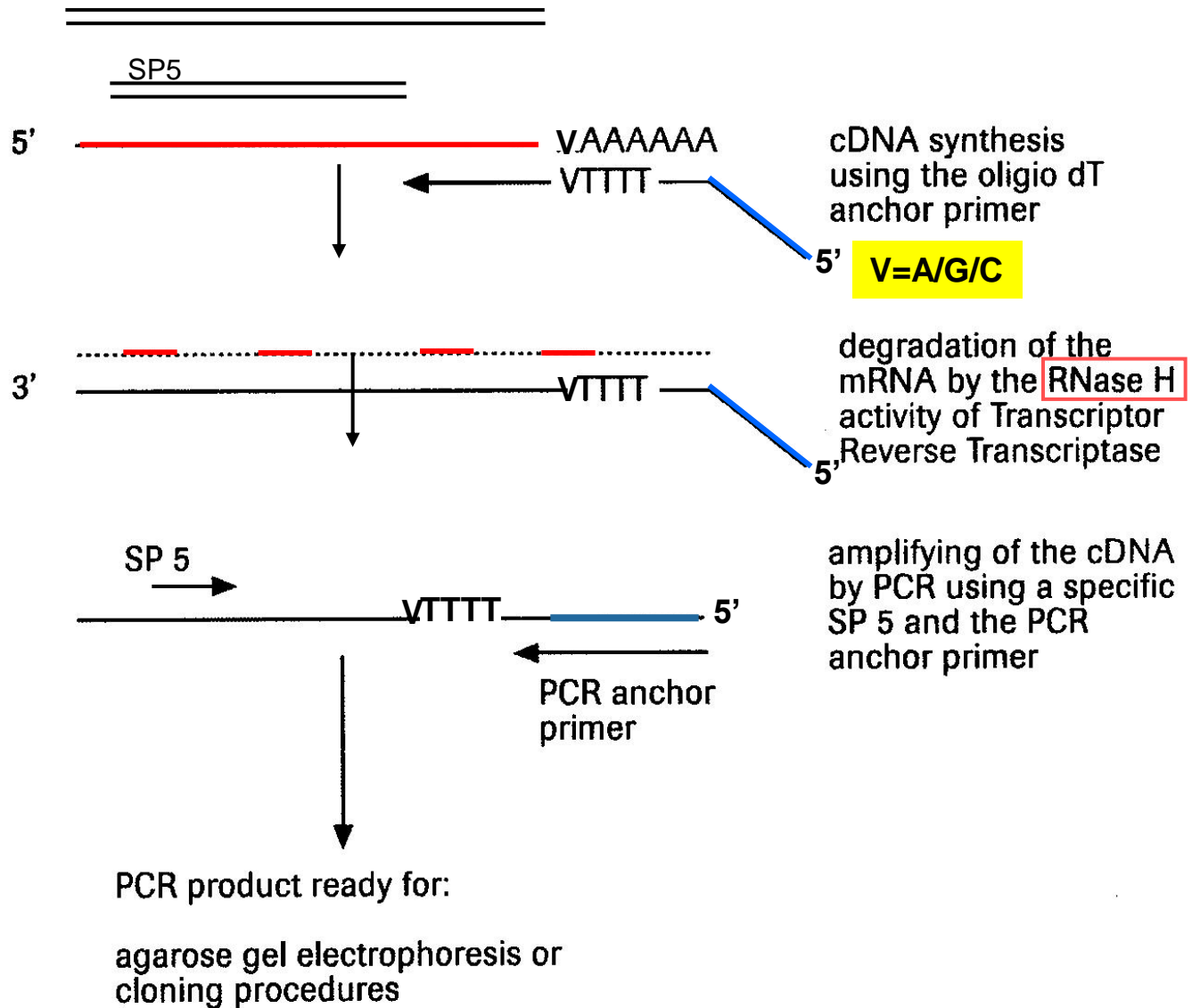


# Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE)

cDNA

Partial cDNA

mRNA (Total)



cDNA synthesis using the oligo dT anchor primer

$V=A/G/C$

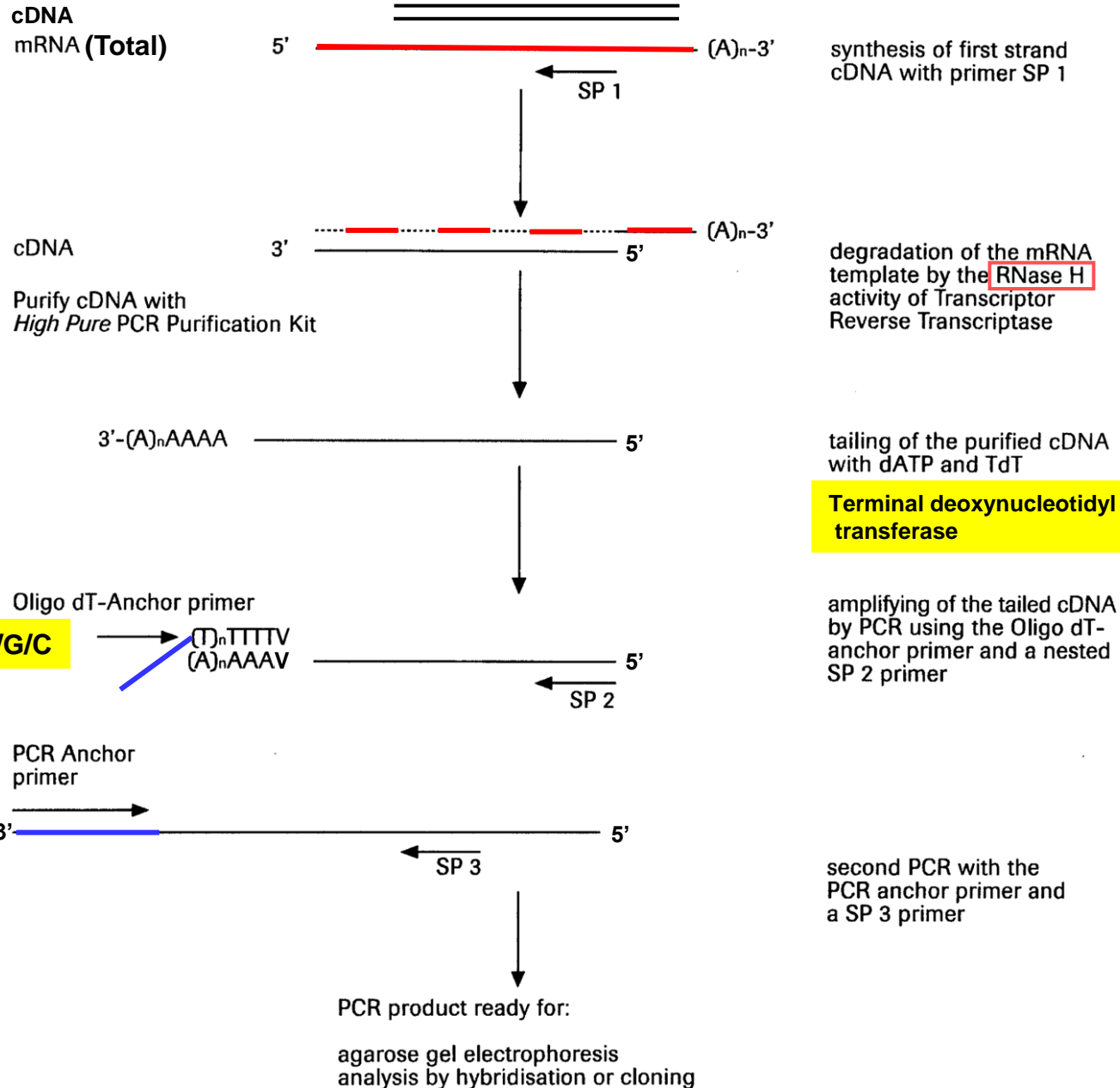
degradation of the mRNA by the RNase H activity of Transcriptor Reverse Transcriptase

amplifying of the cDNA by PCR using a specific SP 5 and the PCR anchor primer

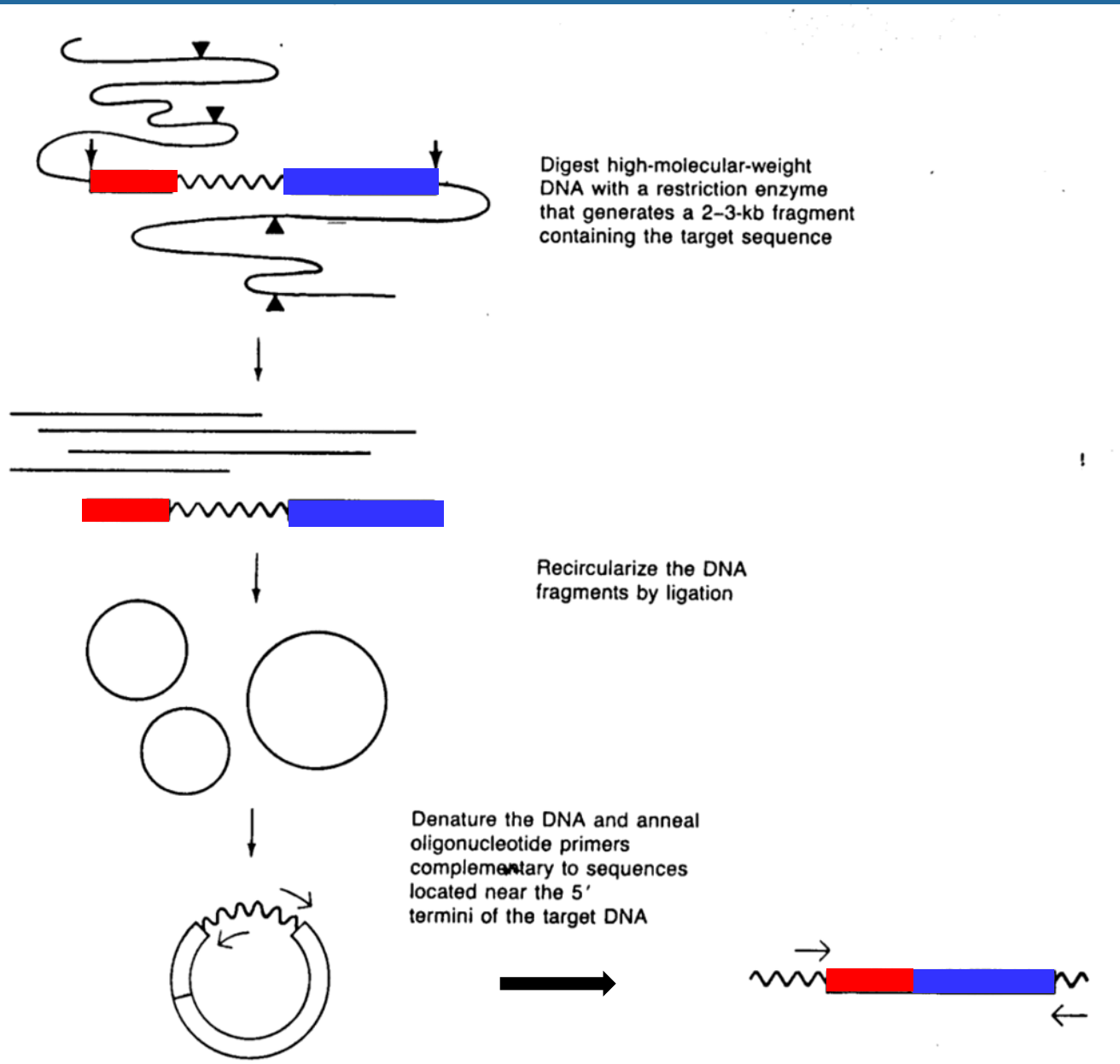
PCR product ready for:

agarose gel electrophoresis or cloning procedures

# Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)



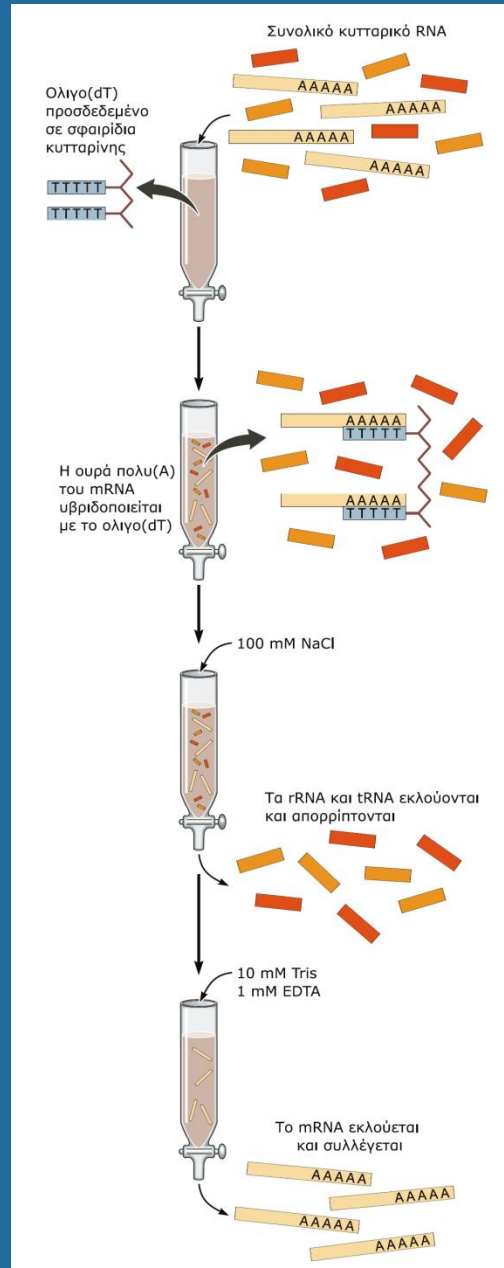
# Inverted PCR





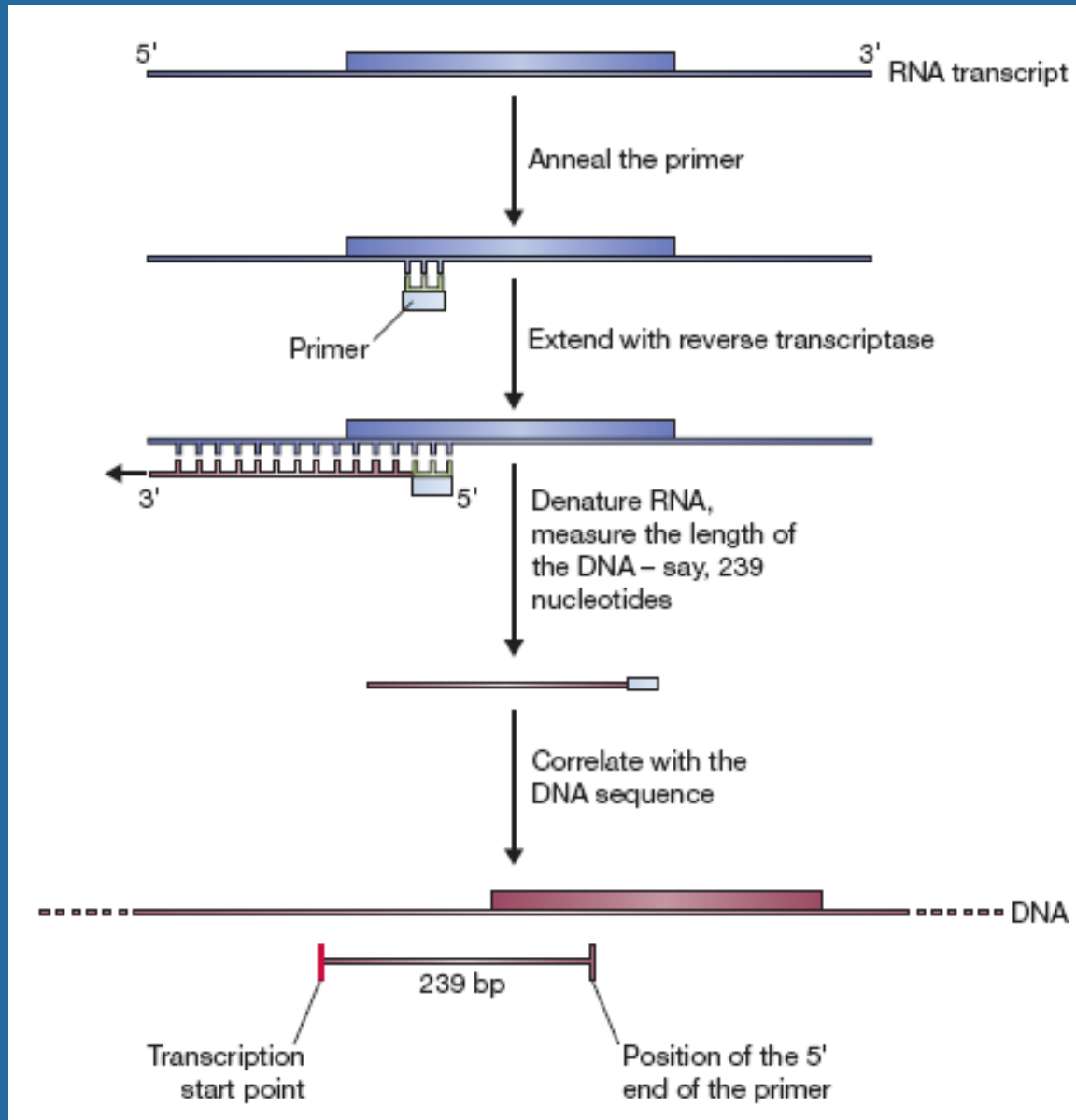
# Απομόνωση πολυ(A+) RNA

ΕΙΚΟΝΑ 4-6

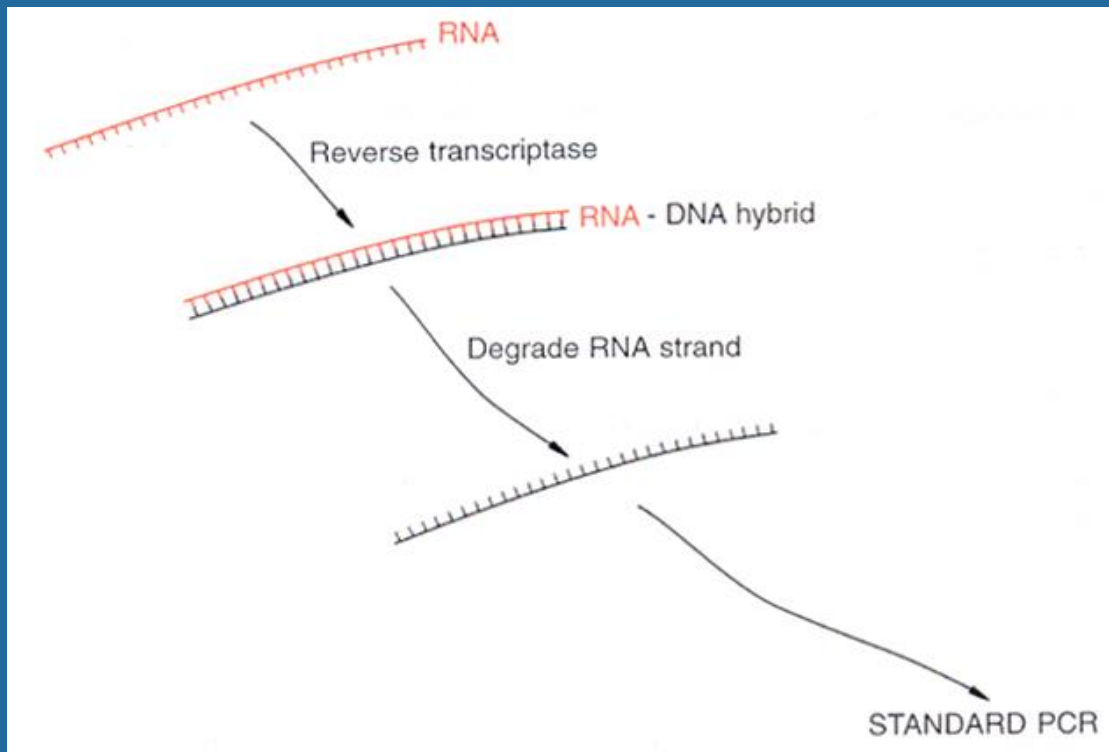


# Προσδιορισμός του +1 (Primer extension)

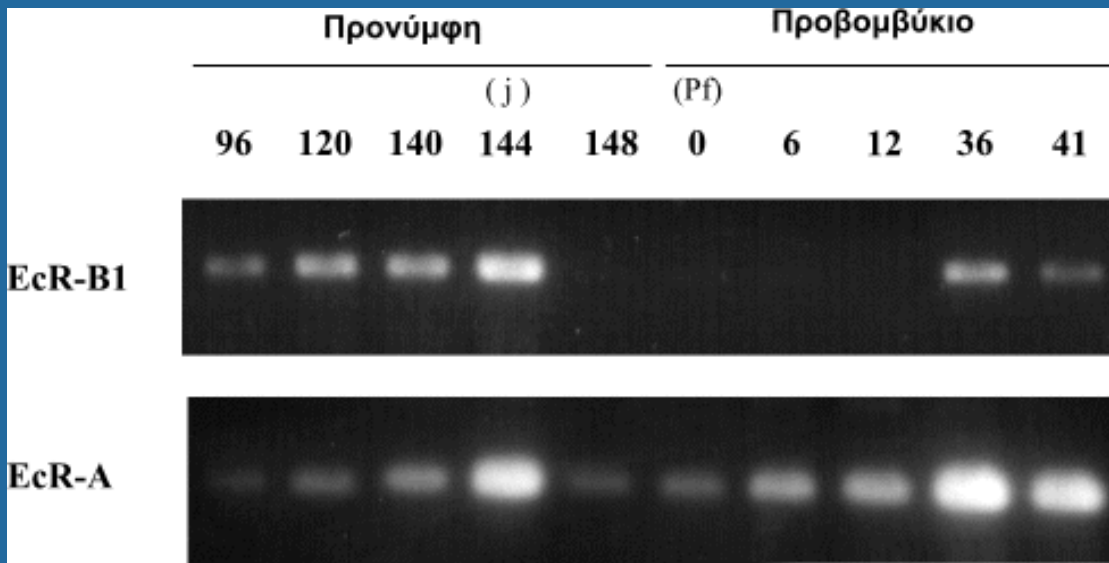
F- 11.6

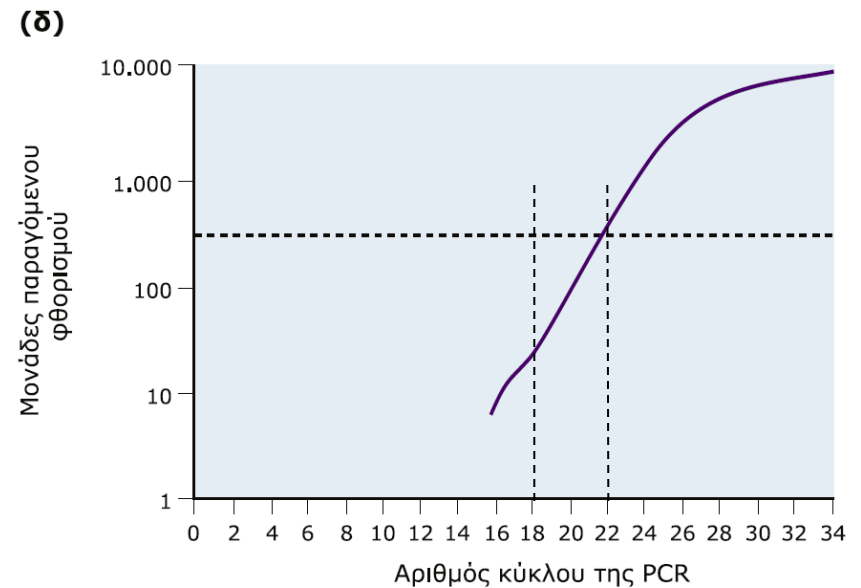
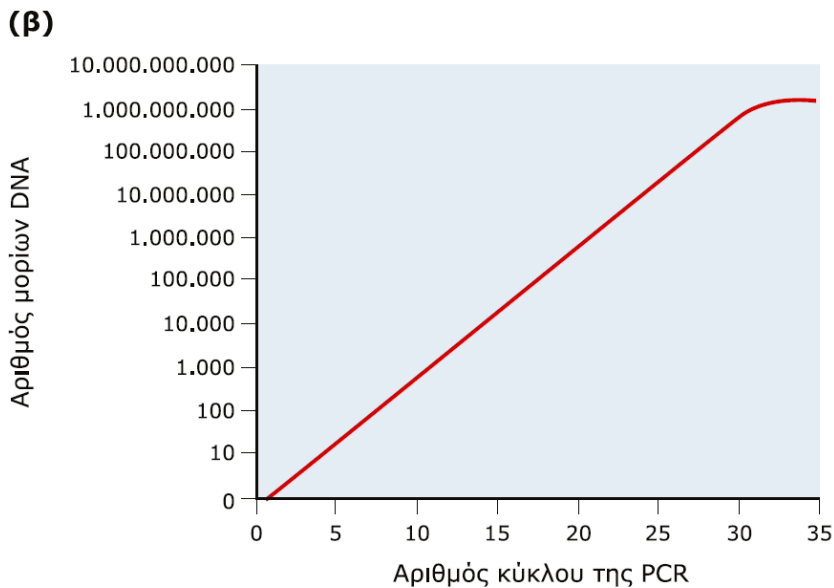
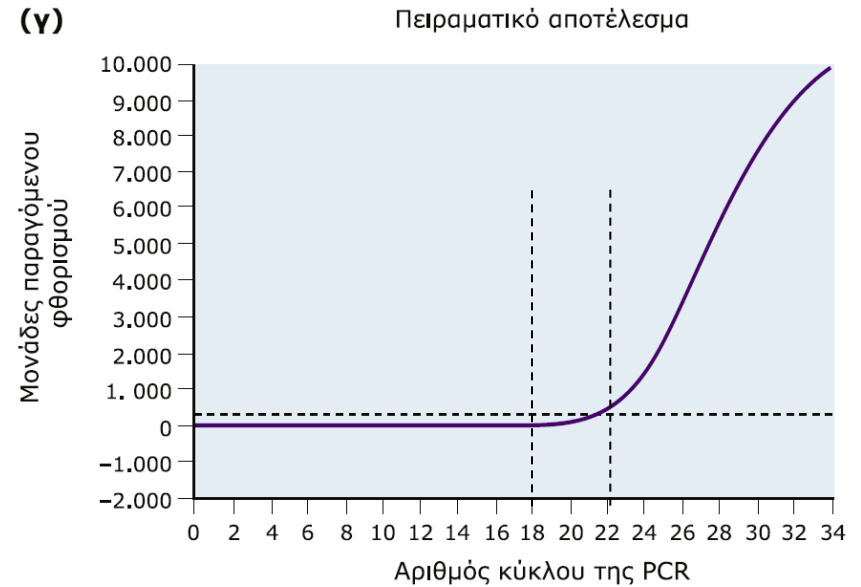
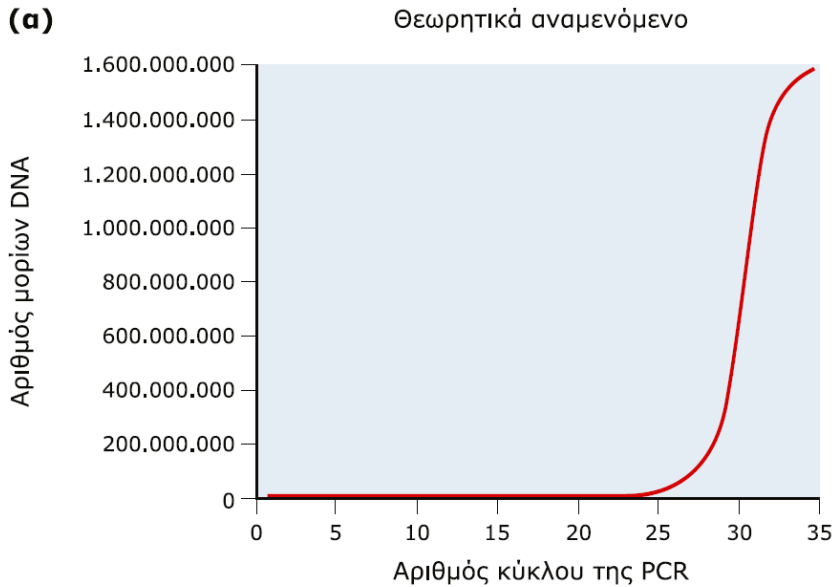






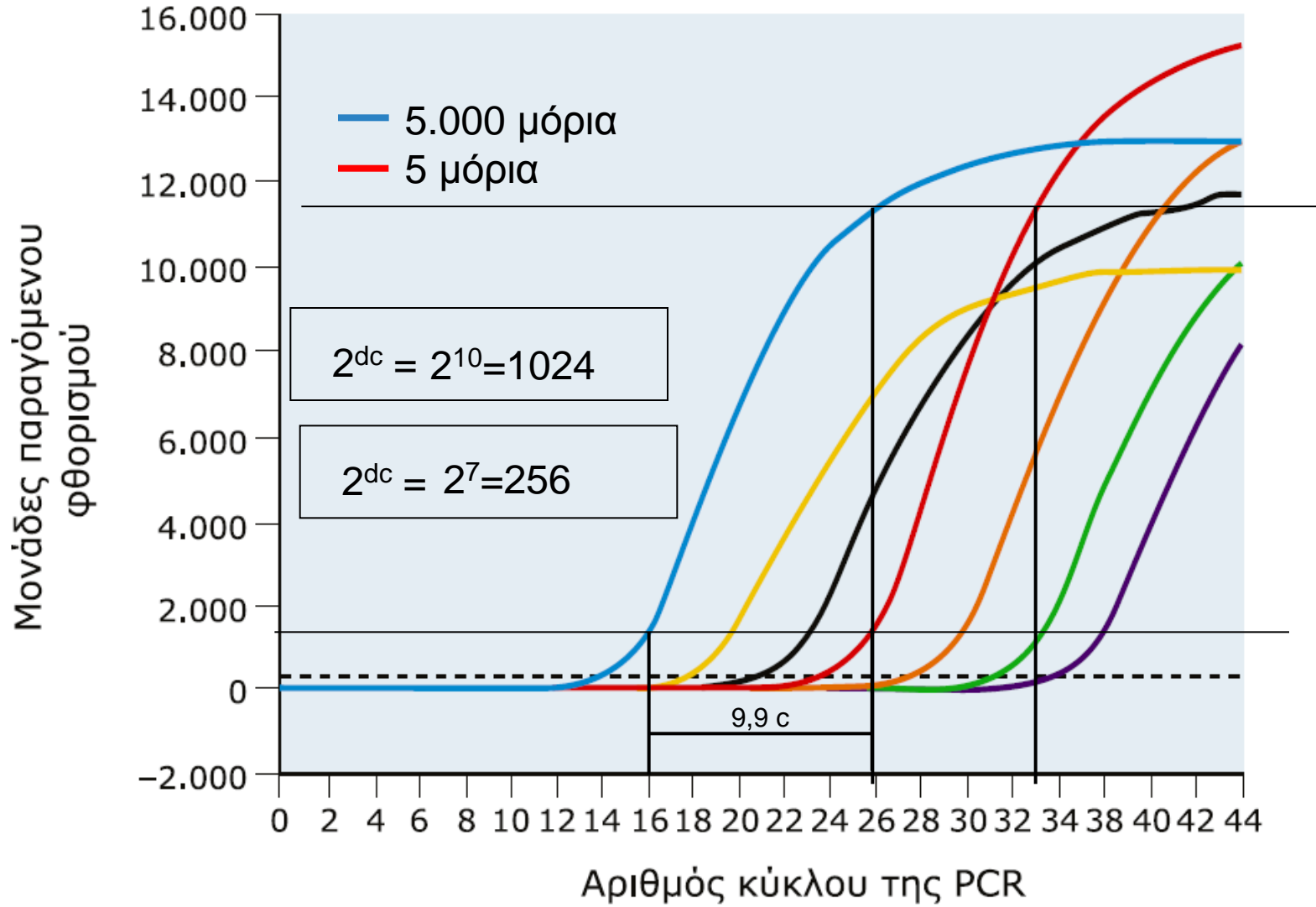
**RT-PCR**

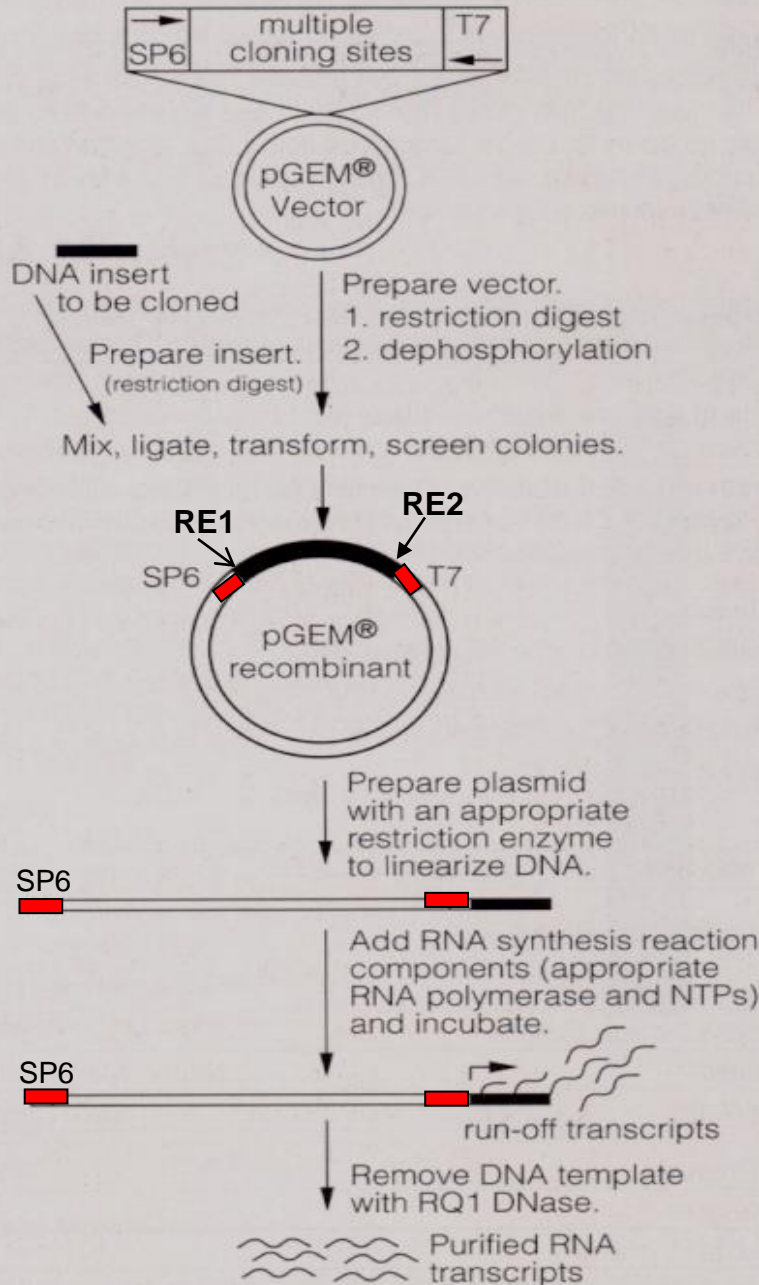




(ε)

Διαδοχικές αραιώσεις



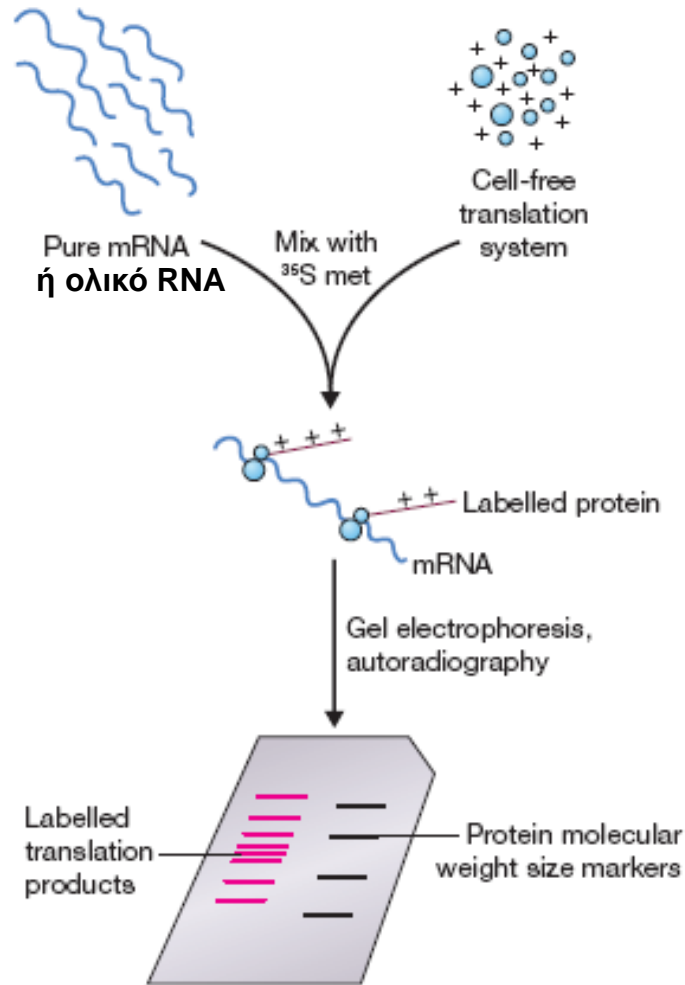


## Sense or anti-sense RNA



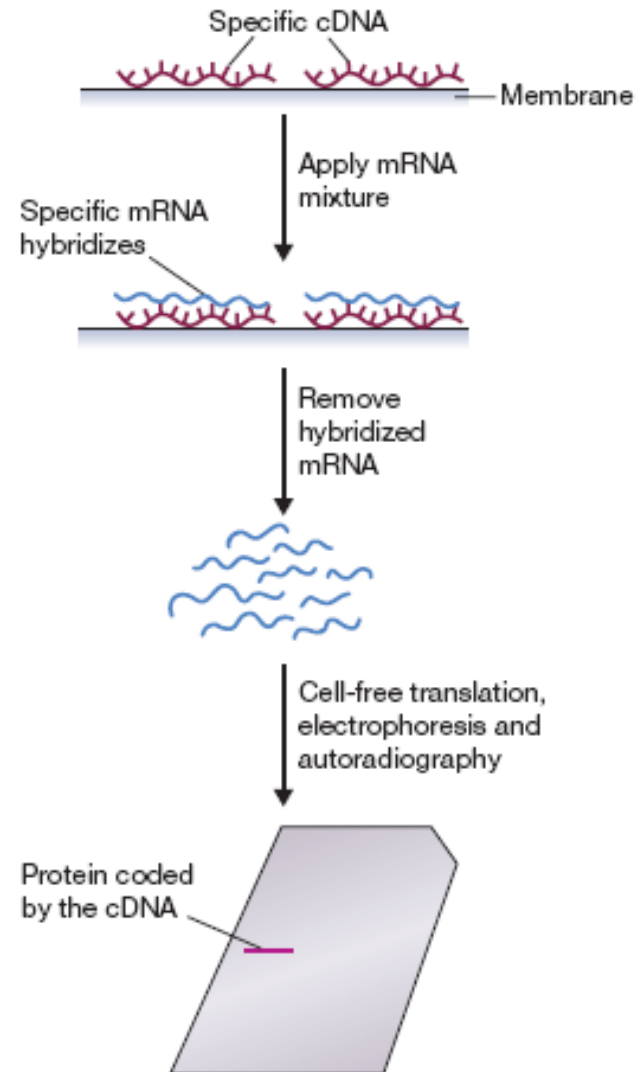
In vitro μετάφραση  
In situ υβρυδοποίηση  
Καταστολή μετάφρασης





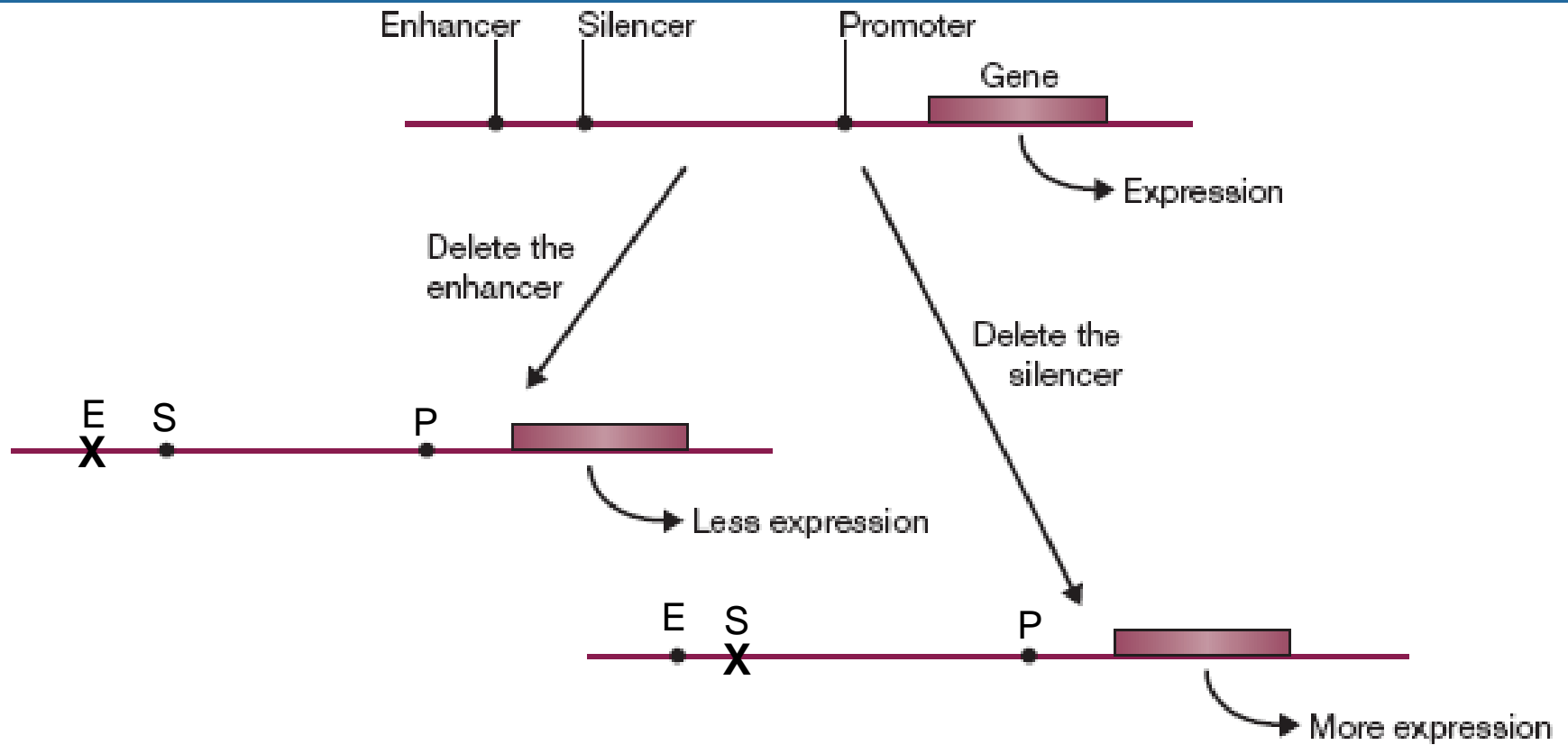
**Figure 11.18**

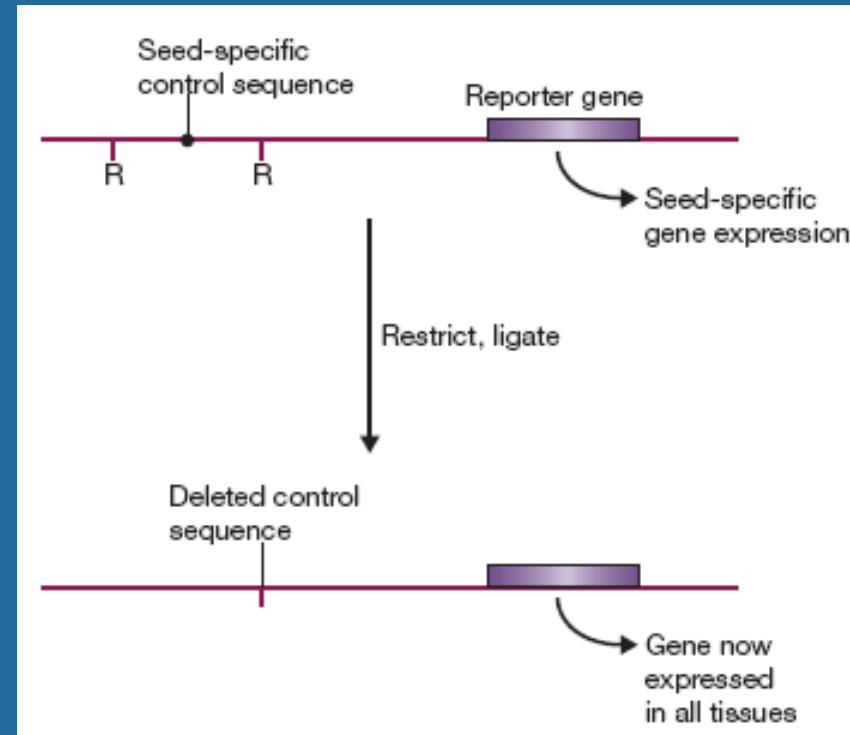
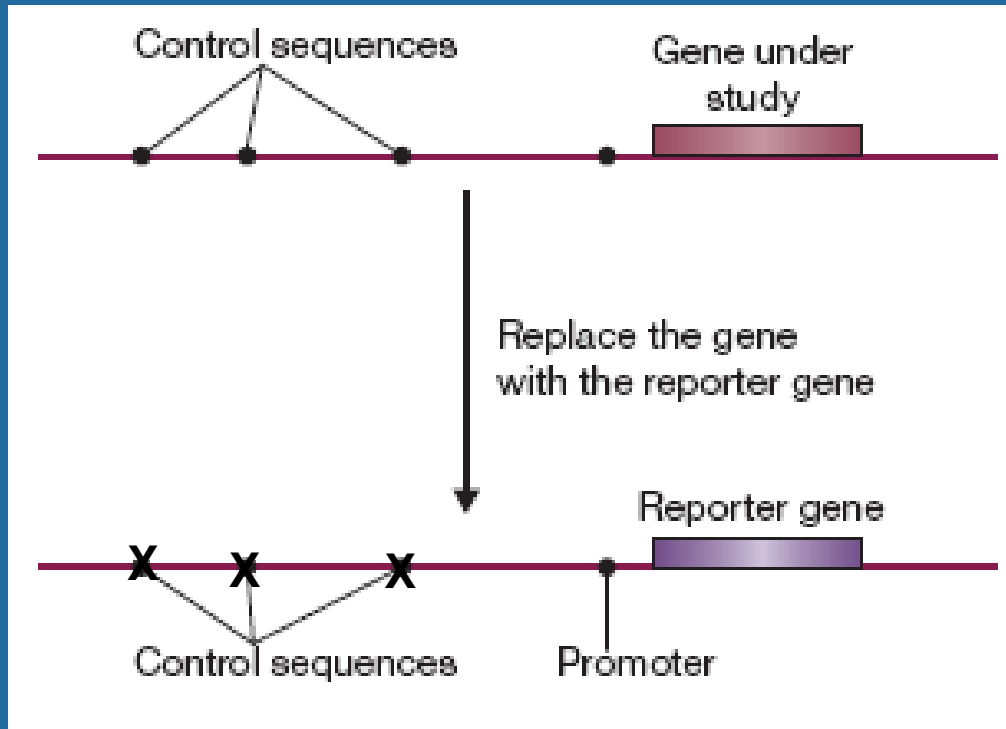
Cell-free translation.



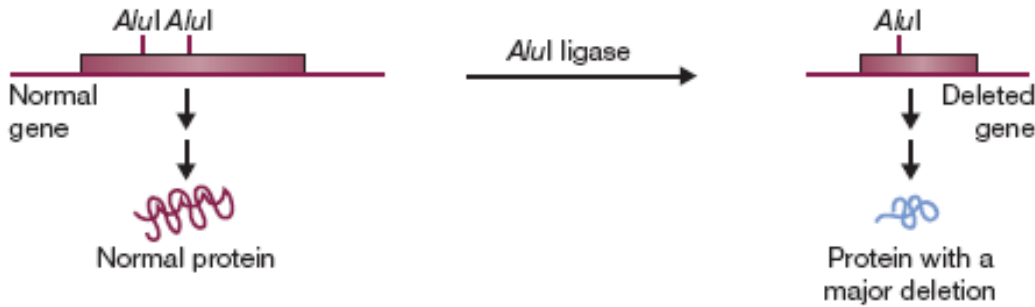
**Figure 11.19**

Hybrid-release translation.

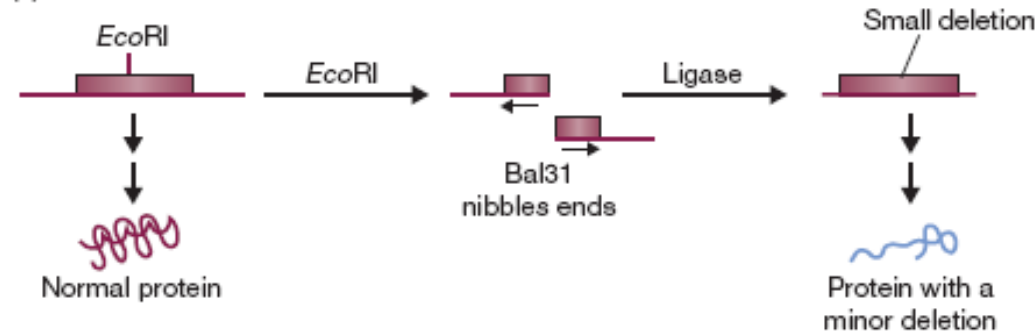




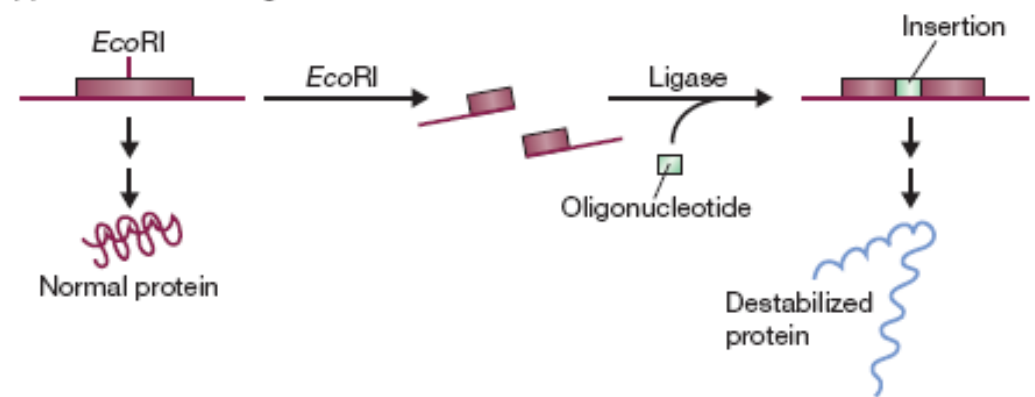
(a) Restriction fragment deletion



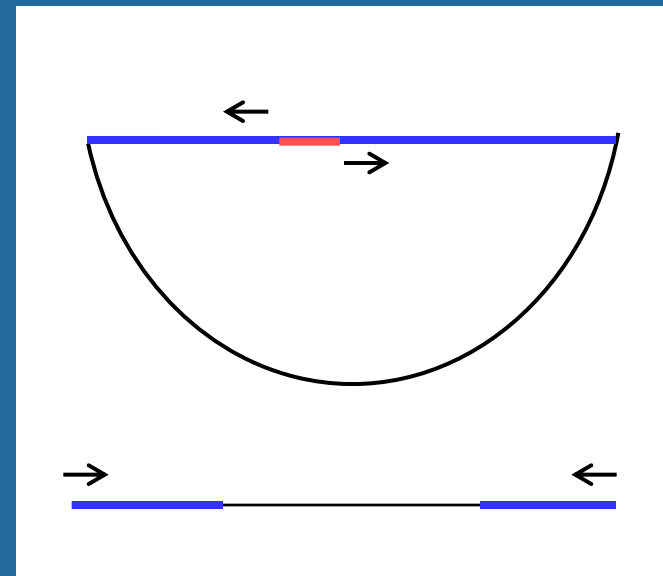
(b) Nucleotide removal at restriction site



(c) Insertion of an oligonucleotide



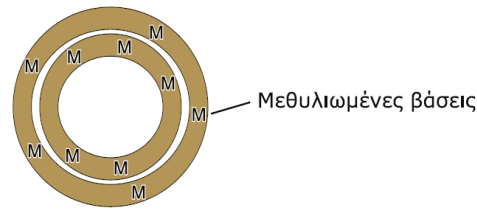
## Inverted PCR Ελείματα



# Σημειακές μεταλλάξεις

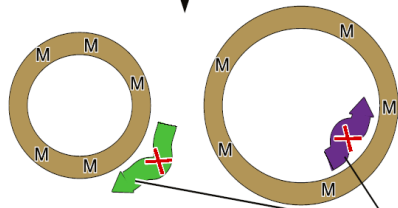
ΕΙΚΟΝΑ 6.3

**(α)** Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από ένα βακτηριακό στέλεχος με ενεργότητα μεθυλάσης *dam*



Αποδιάταξη του πλασμιδίου και υβριδοποίηση των μεταλλαξιγόνων ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινήτων

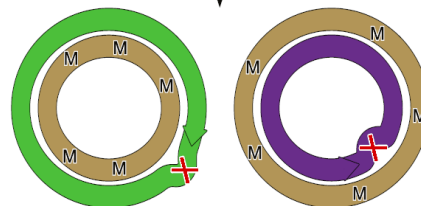
**(β)** Αποδιάταξη του πλασμιδιακού DNA, προσθήκη των μεταλλαξιγόνων εκκινήτων και υβριδοποίησή τους στους κλώνους του πλασμιδίου



Μεταλλαξιγόνοι εκκινήτες οι οποίοι δε ζευγαρώνουν στο σημείο που πρόκειται να εισαχθεί η μεταλλαγή, αλλά ζευγαρώνουν με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν αυτού

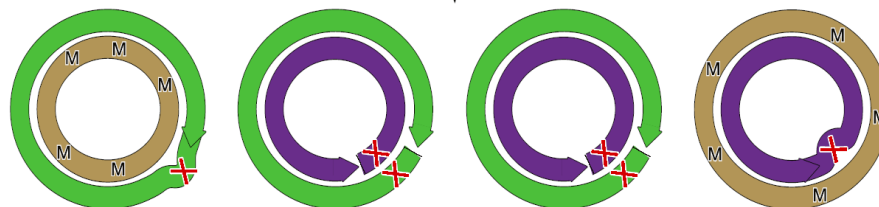
Εκκίνηση της σύνθεσης νέων κλώνων από την πολυμεράση

**(γ)** Επέκταση μεταλλαξιγόνων εκκινήτων



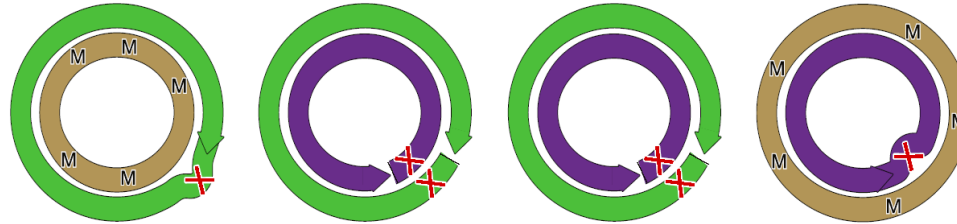
Αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επέκταση εκκινήτων

**(δ)** Διαδοχικές επαναλήψεις των β και γ σε ένα θερμοκυκλοποιητή



Πολλαπλοί κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης των εκκινήτων

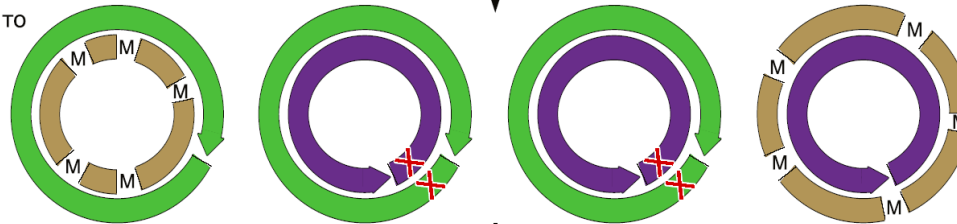
**(δ)** Διαδοχικές επαναλήψεις των β και γ σε ένα θερμοκυκλοποιητή



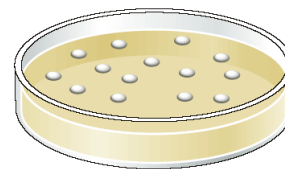
Αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επέκταση εκκινητών

Πολλαπλοί κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης των εκκινητών

**(ε)** Πέψη των προϊόντων με το ένζυμο DpnI, το οποίο κόβει μεθυλιωμένες και ημιμεθυλιωμένες θέσεις GATC



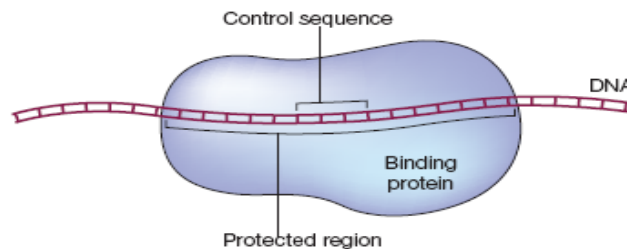
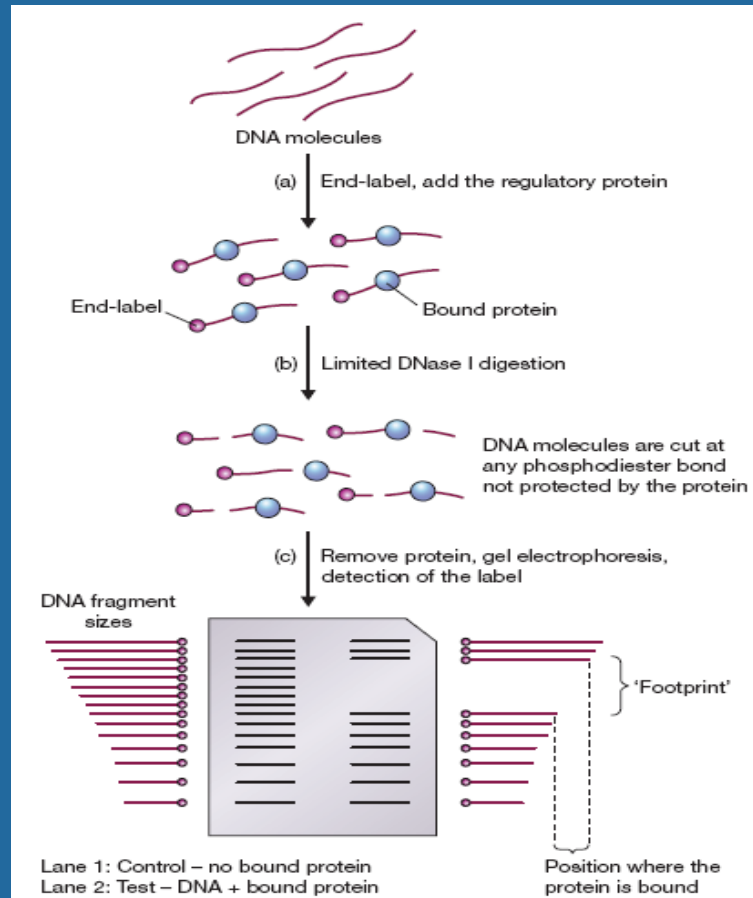
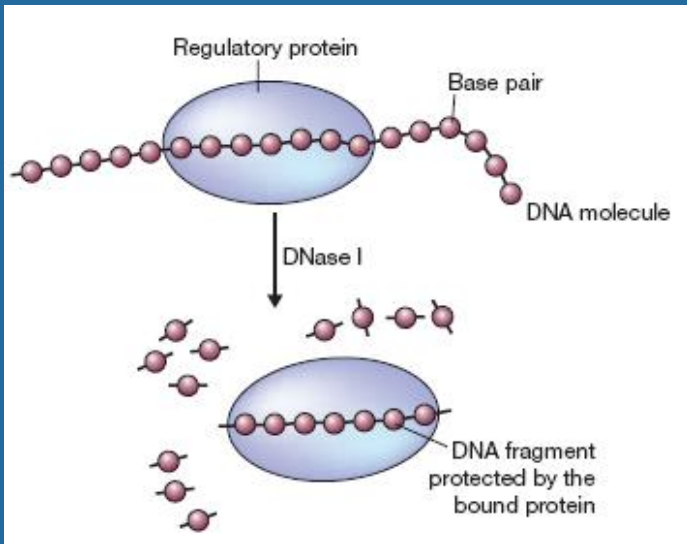
**(στ)** Μετασχηματισμός βακτηρίων, απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τυχαίες αποικίες και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία της επιθυμητής μεταλλαγής



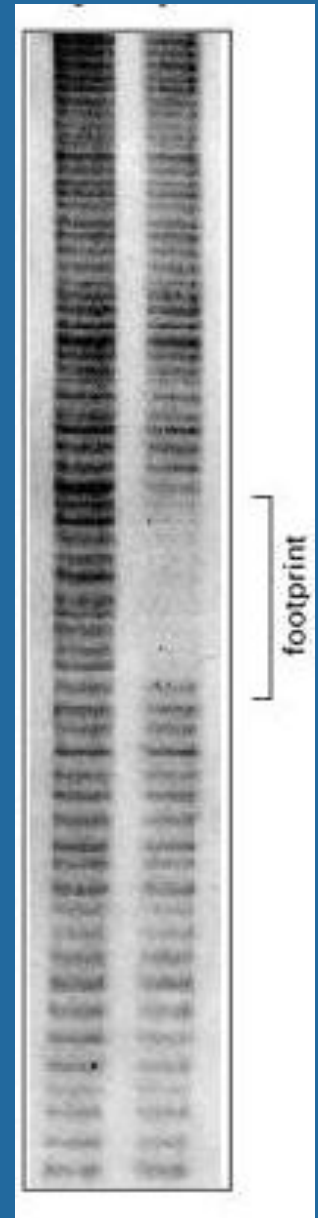
# Αλληλεπιδράσεις Πρωτεϊνών-DNA

## Ιχνηλάτηση περιοχής πρόσδεσης

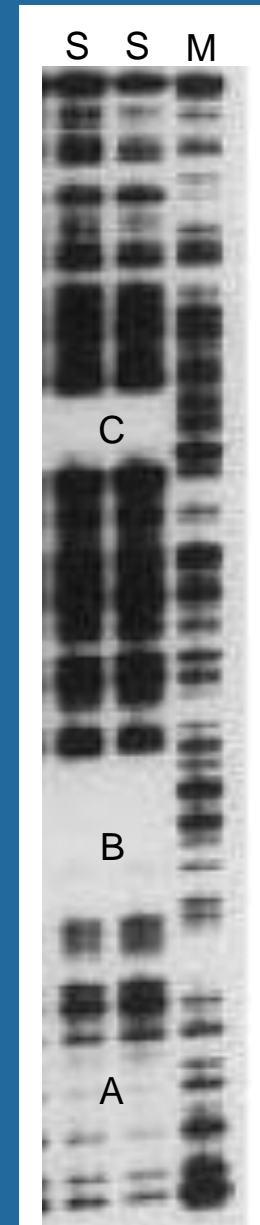
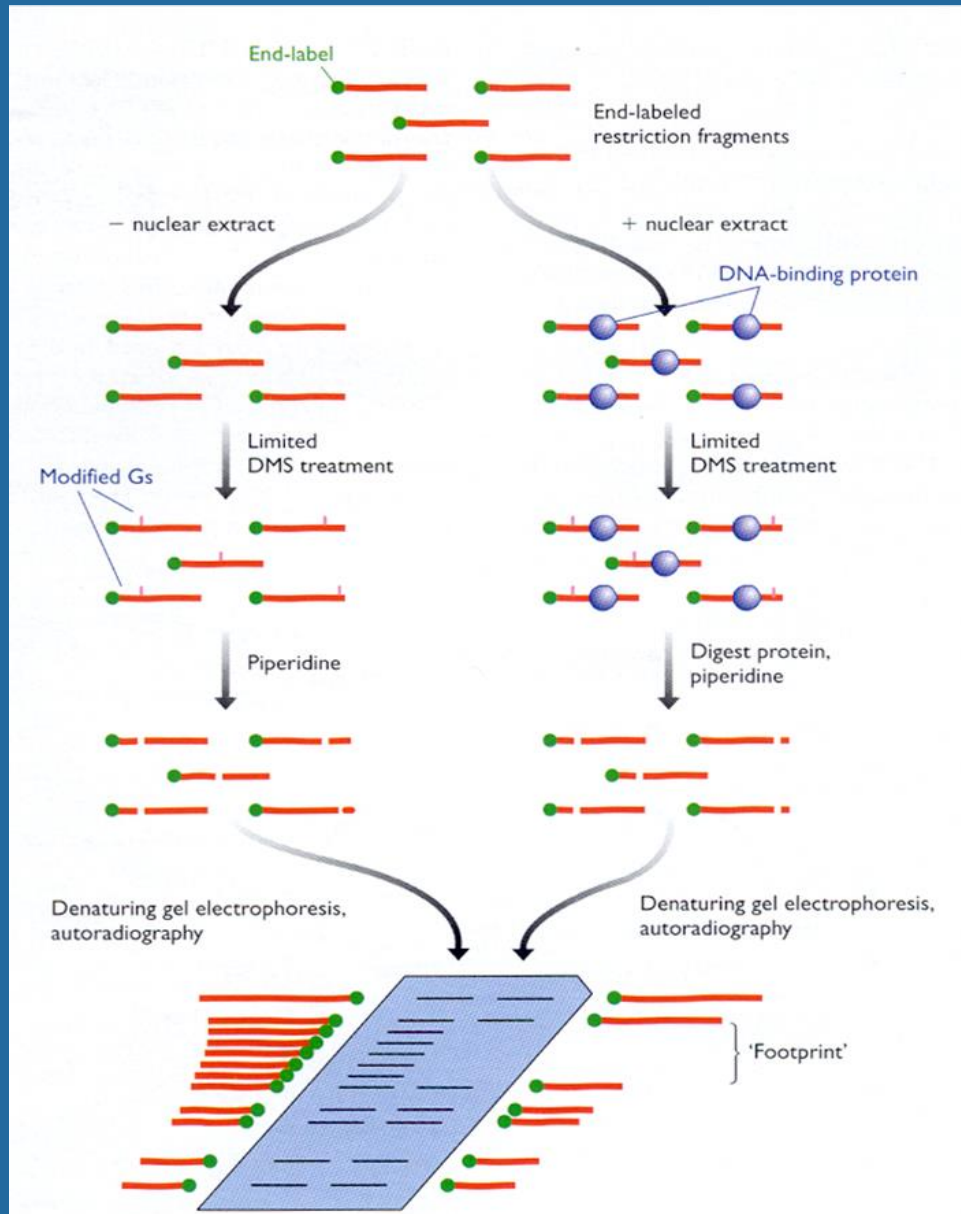
Fig.11.12, 11.13



Figu  
A bound  
is much



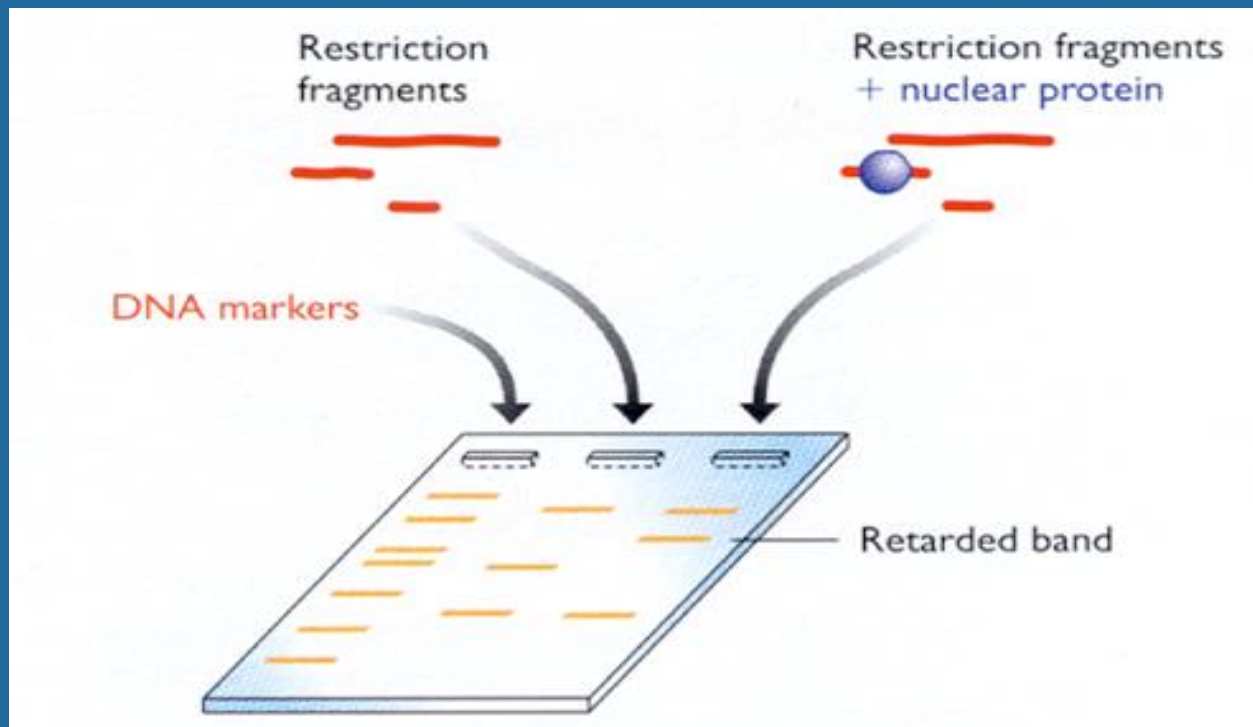
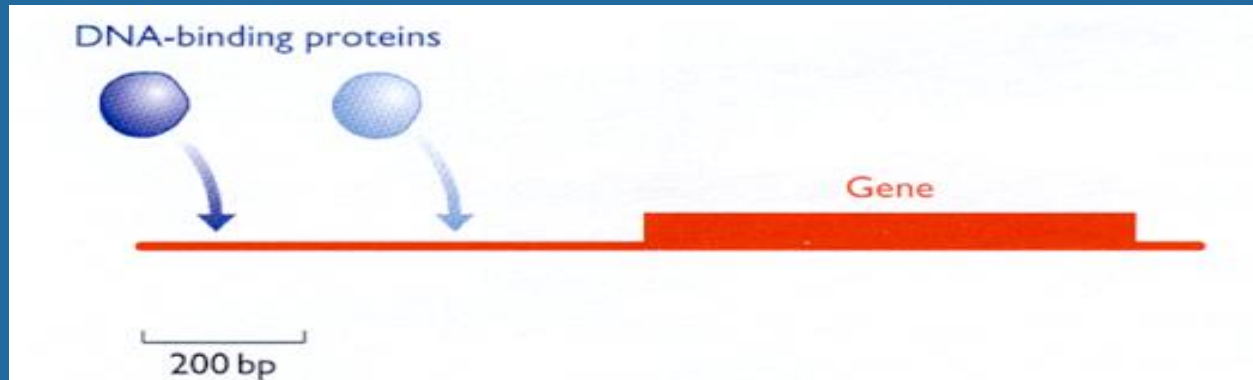
# Αλληλεπιδράσεις Πρωτεϊνών-DNA Ιχνηλάτηση Θέσεων Πρόσδεσης





# Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-DNA Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Fig.-11.9



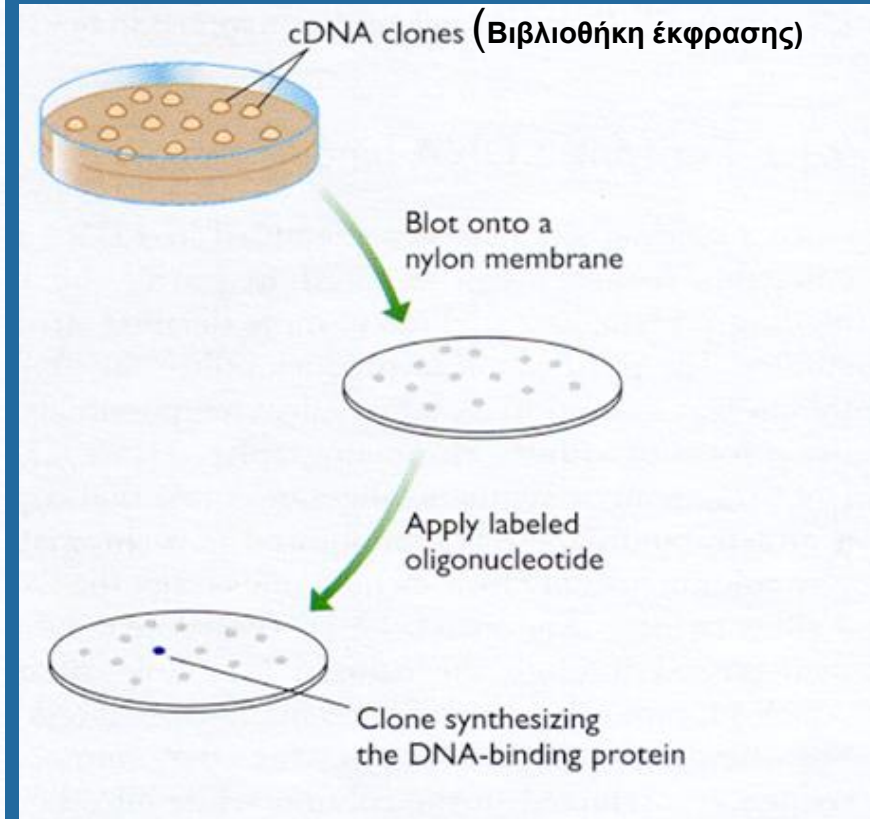
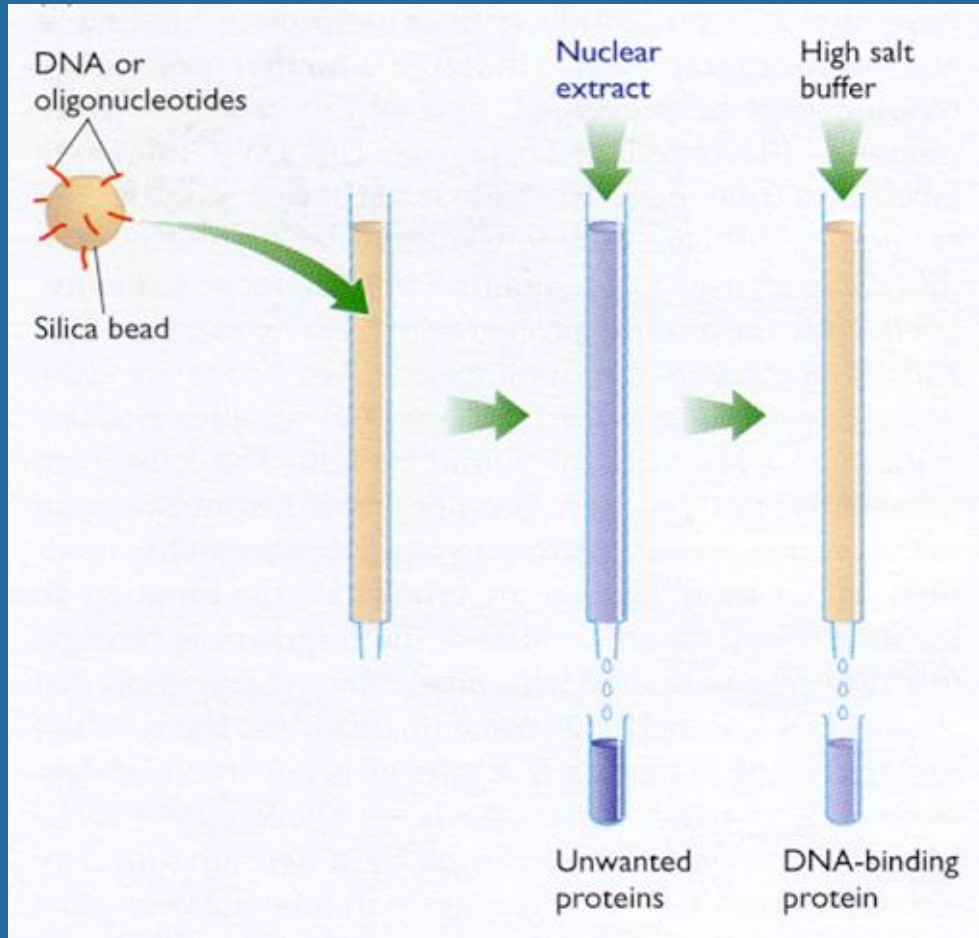
# Αλληλεπιδράσεις Πρωτεϊνών-DNA

## Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

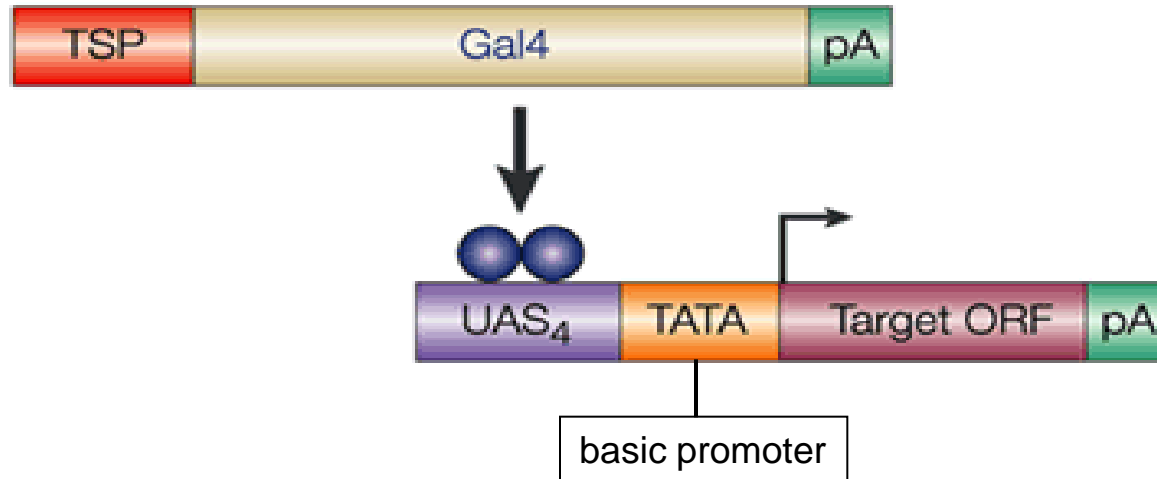
Nuclear extract or protein	-	+	+	+
Antibody	-	-	+	-
Competitor 100X	-	-	-	+



# Απομόνωση ρυθμιστικών παραγόντων

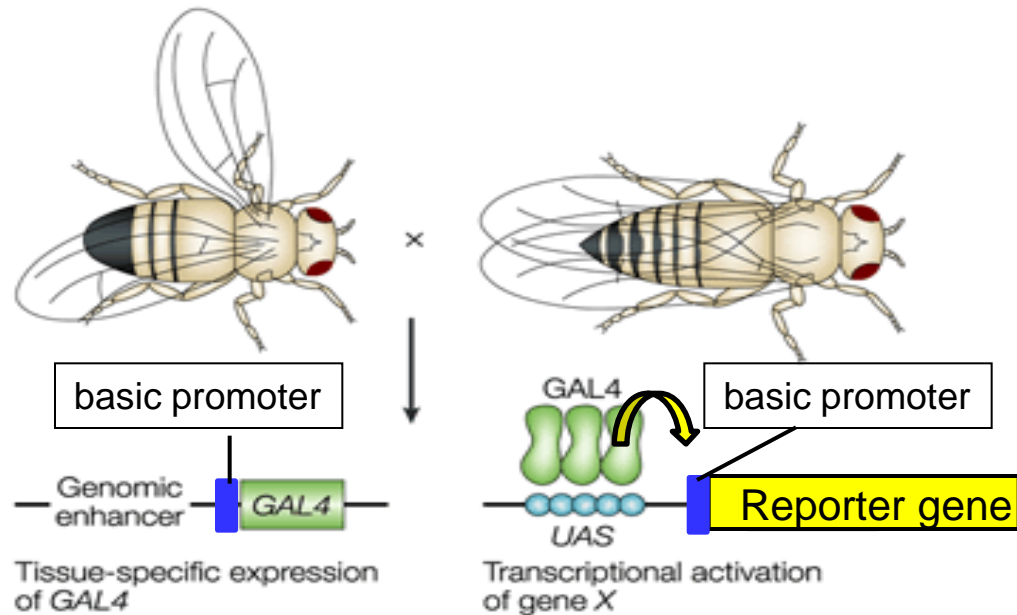


# GAL4

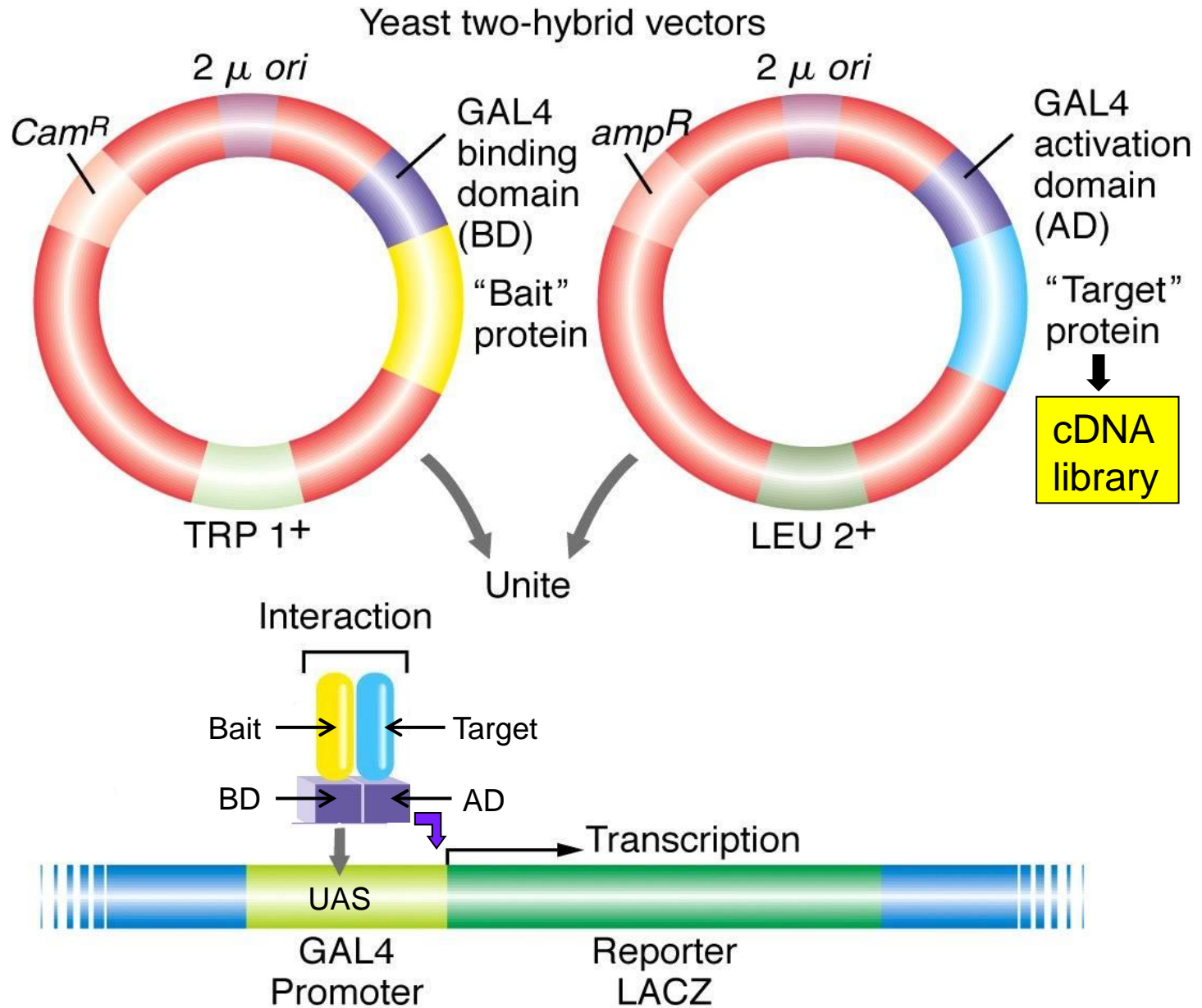


Enhancer-trap GAL4

UAS-gene X



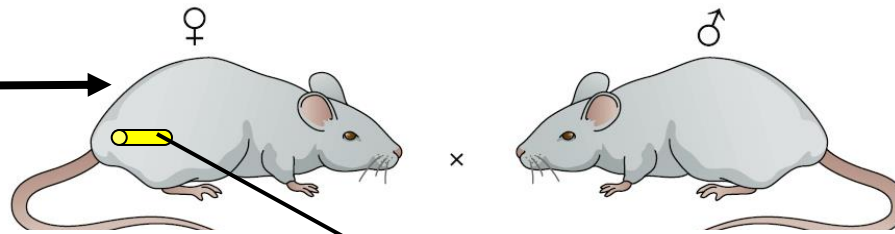
# Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών



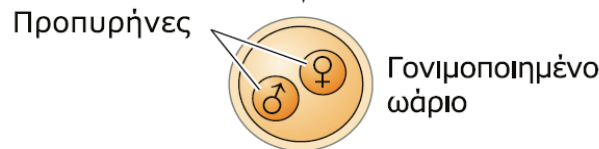
# Μετασχηματισμός σε θηλαστικά (ποντικούς)

EIKONA 6.14

Ορμονική θεραπεία-Υπερωορρηξία



Λήψη γονιμοποιημένων ωαρίων από τους ωαγωγούς



Μικροέγχυση του εξωγενούς DNA στον ένα προπυρήνα

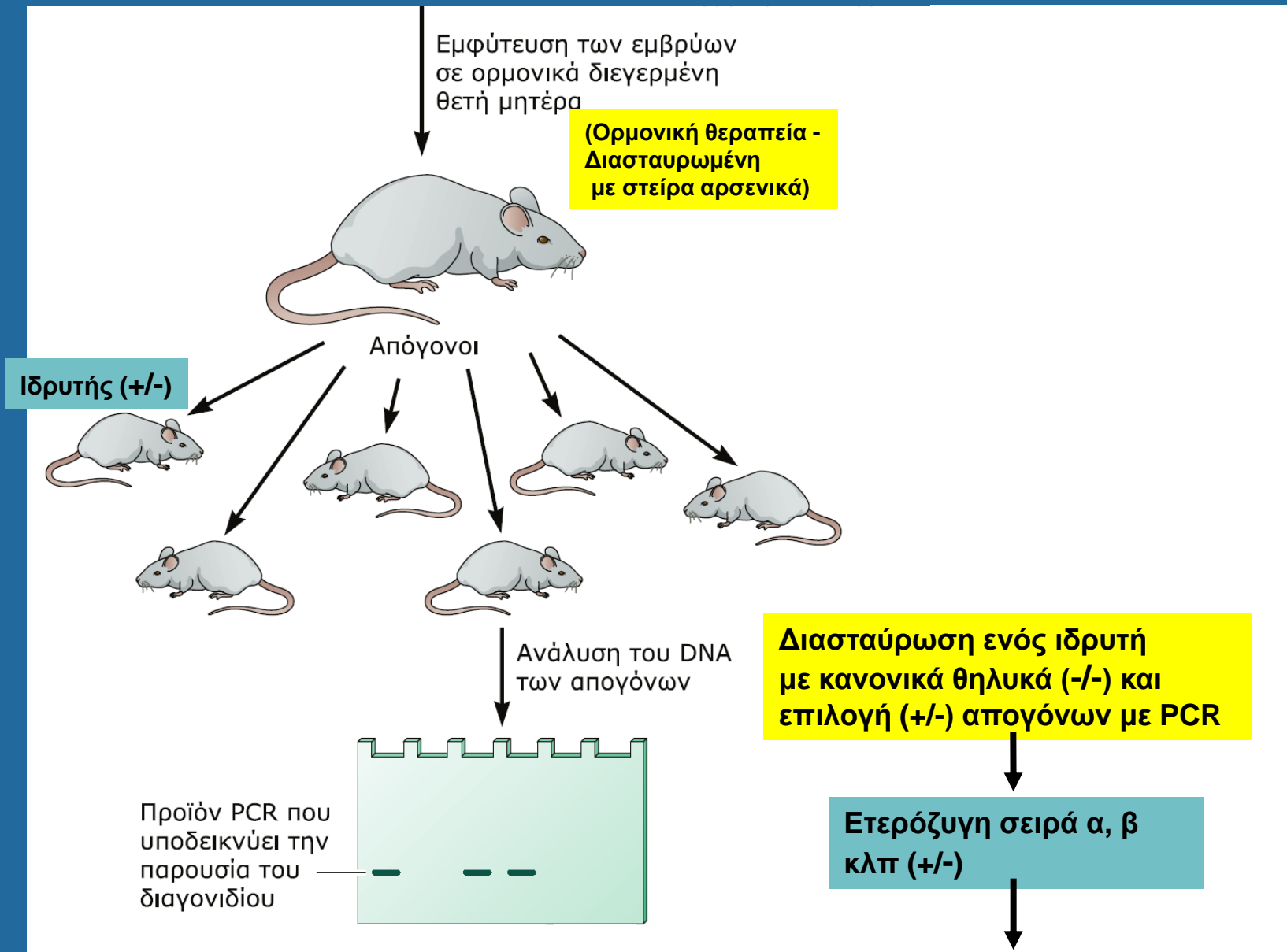
Υπό μελέτη γονίδιο

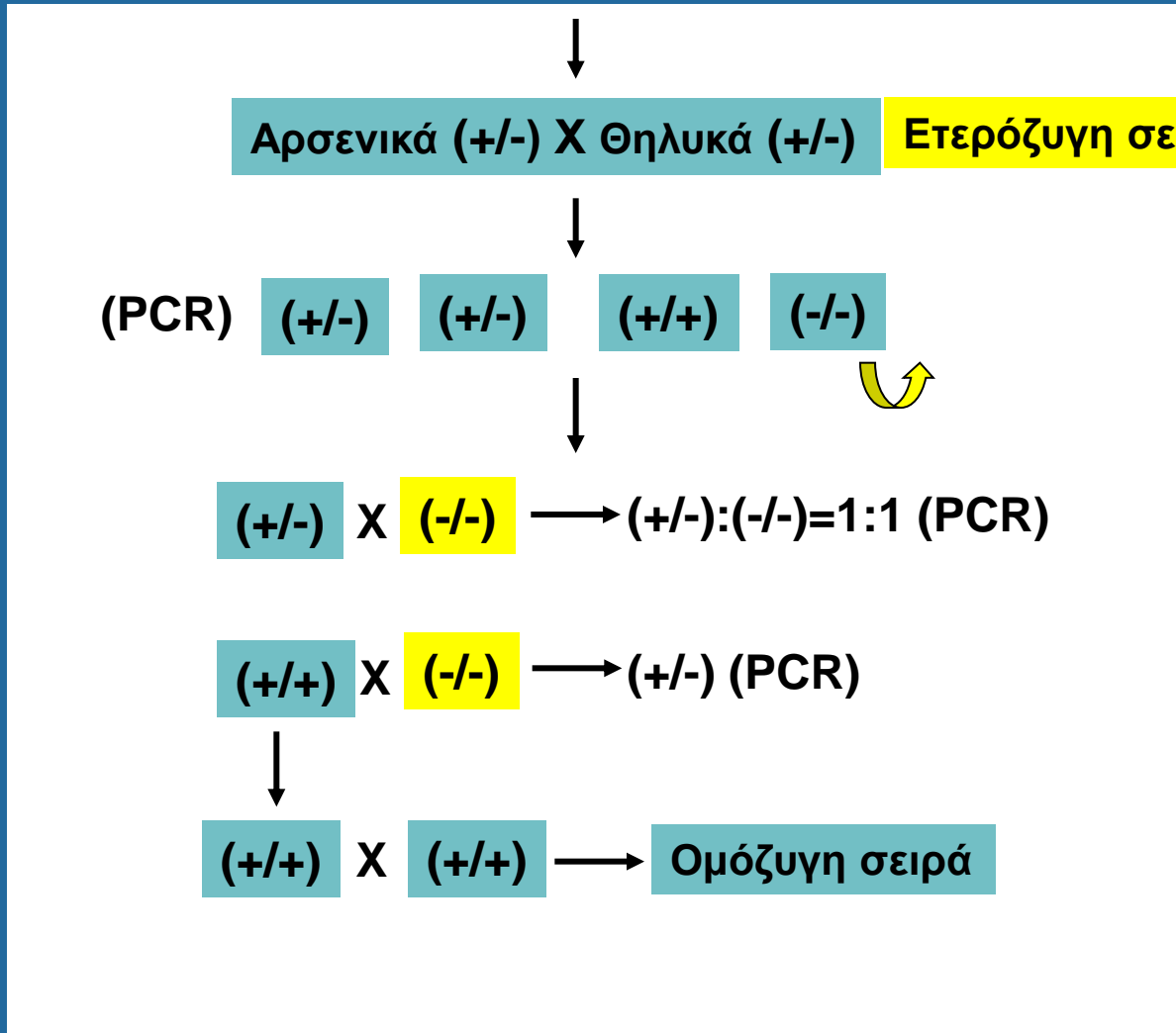


Κατάλληλοι υποκινητές  
Ετερόλογος ανασυνδιασμός

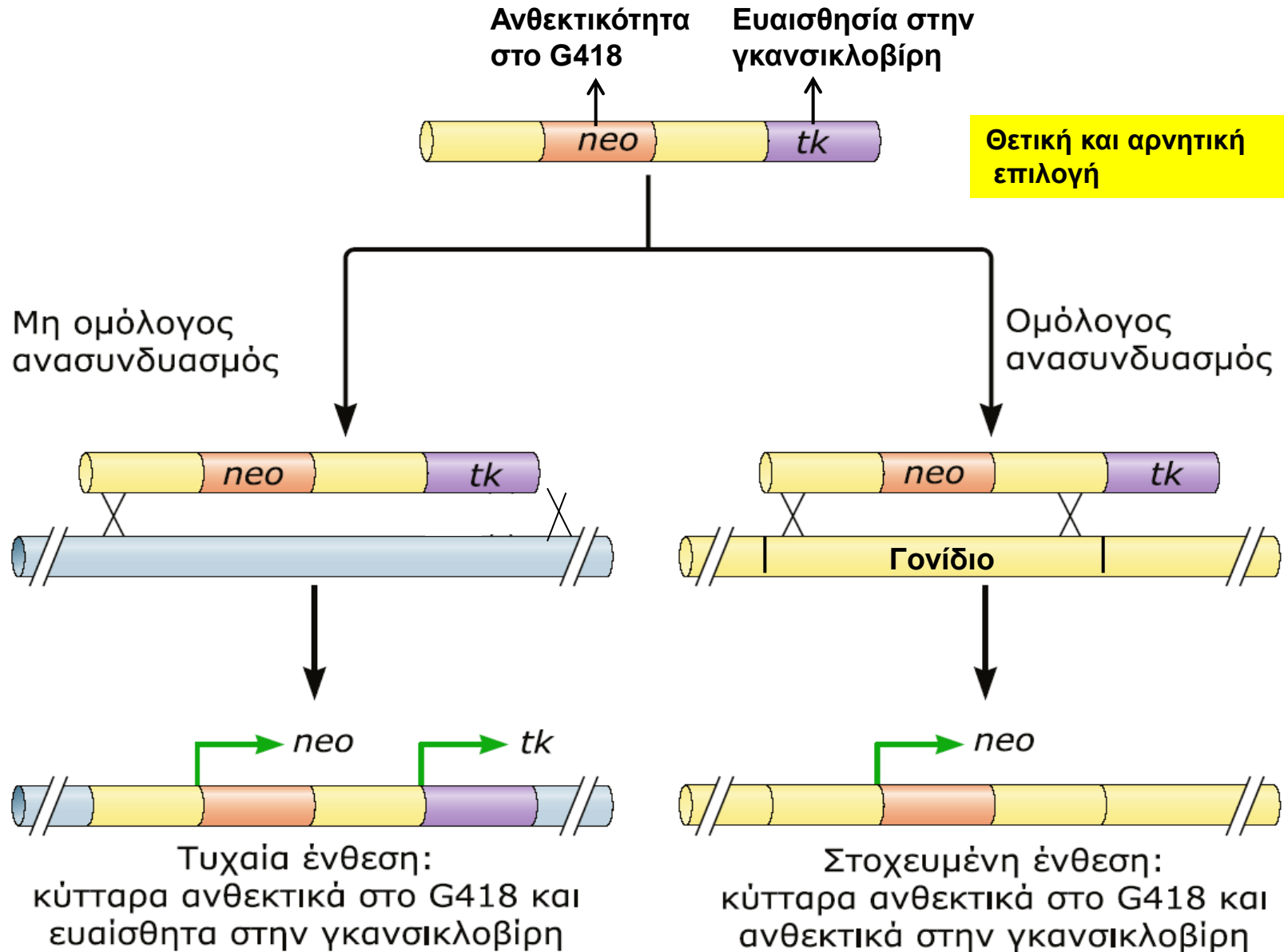
Πιπέτα που χρησιμοποιείται προκειμένου να ασκηθεί υποπίεση και να σταθεροποιηθεί το ωάριο κατά τη διάρκεια της μικροέγχυσης





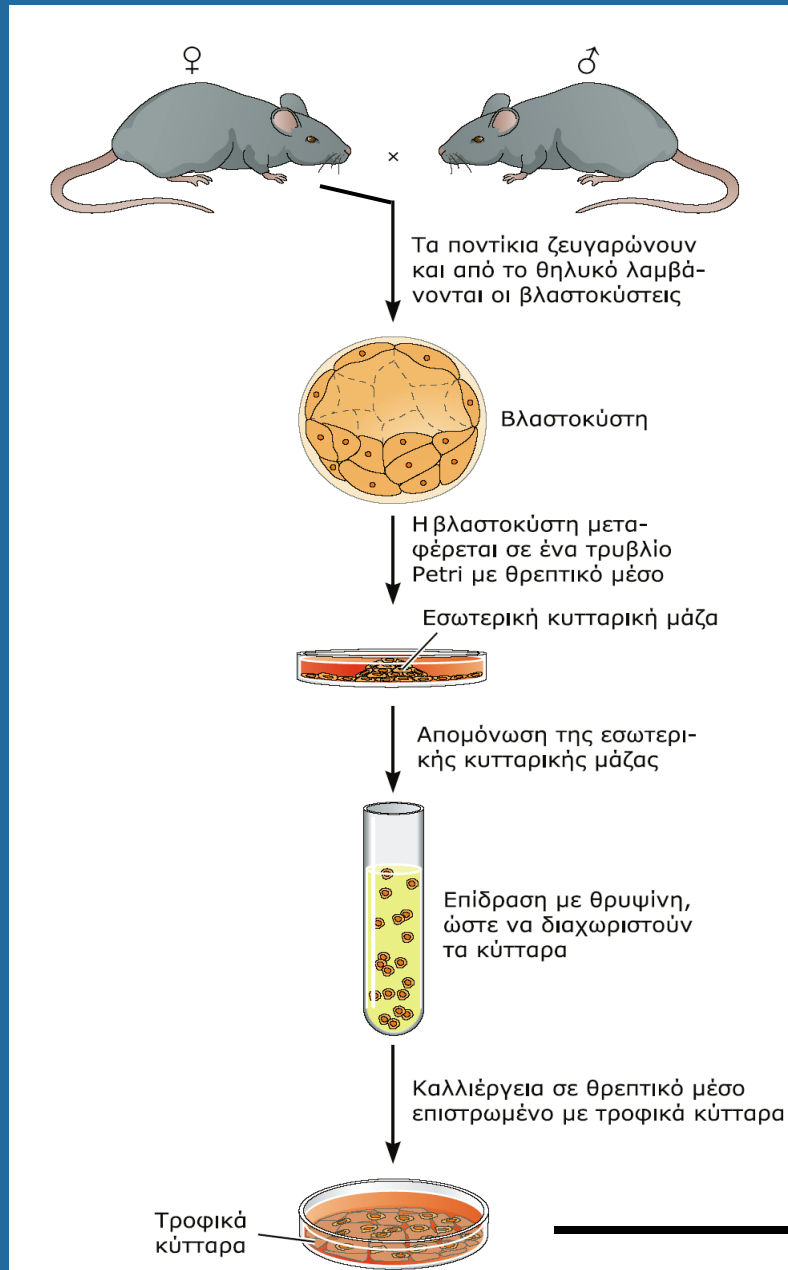






# Μετασχηματισμός σε θηλαστικά (ποντικούς) Μέθοδος βλαστοκυττάρων

ΕΙΚΟΝΑ 6.16

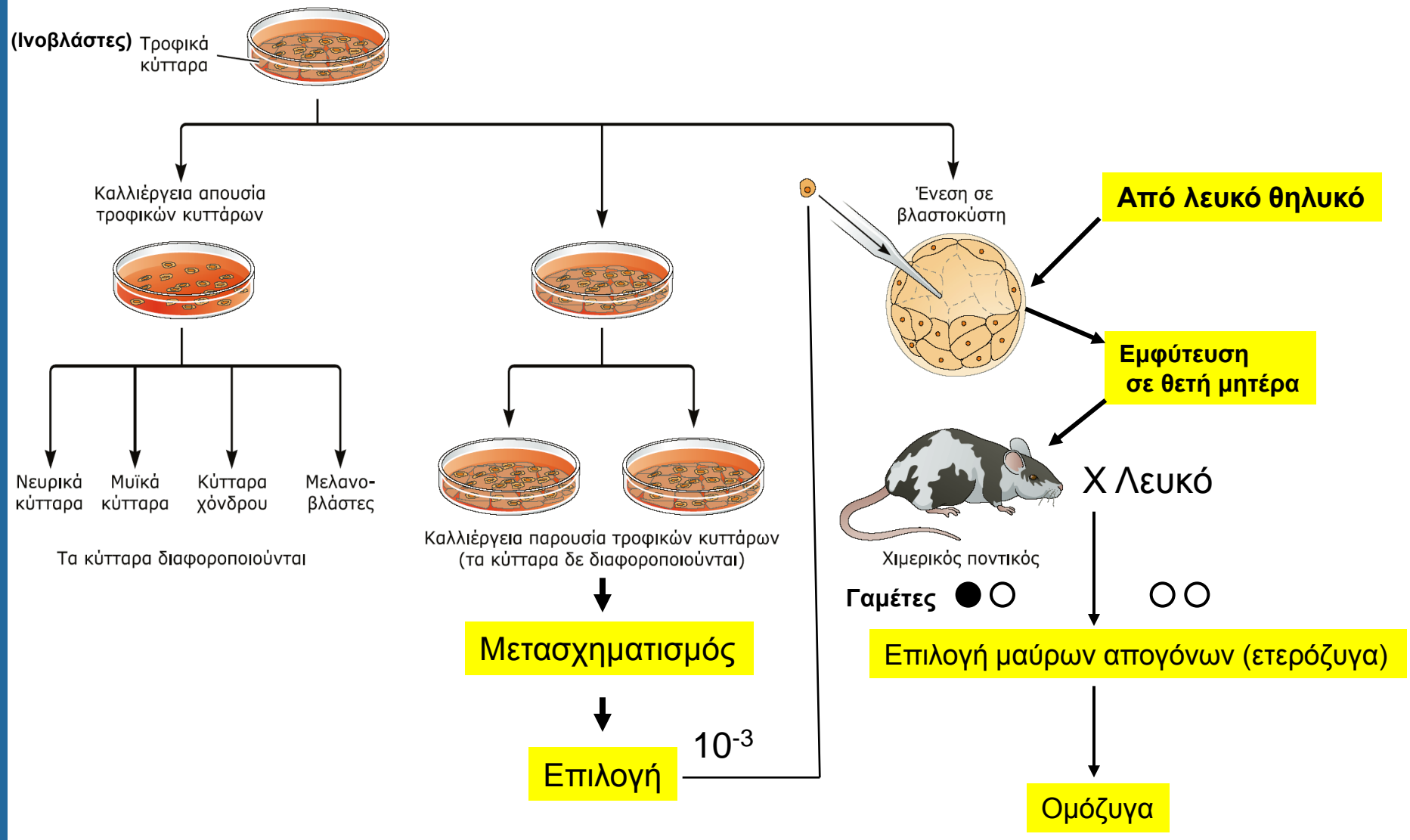


Μαύρα ποντίκια

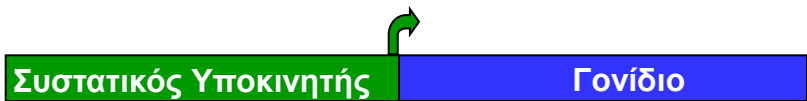
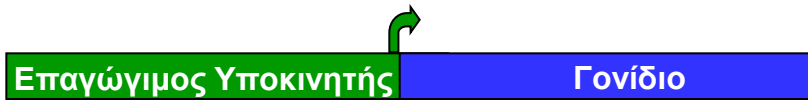
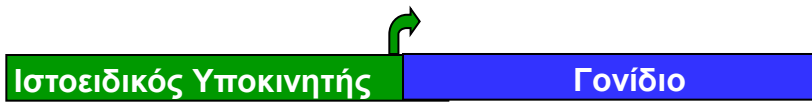
Μετασχηματισμός επιλογή

# Μετασχηματισμός στα θηλαστικά (ποντικούς) Μέθοδος βλαστοκυττάρων

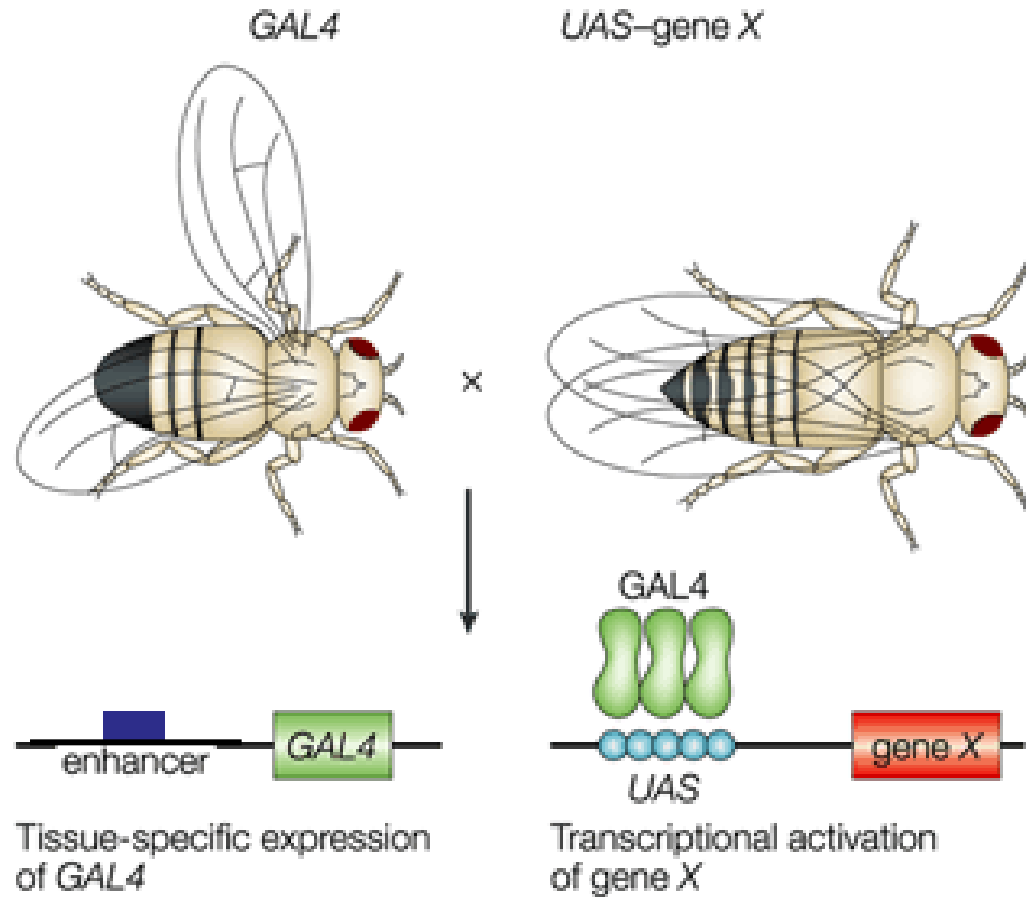
ΕΙΚΟΝΑ 6.16



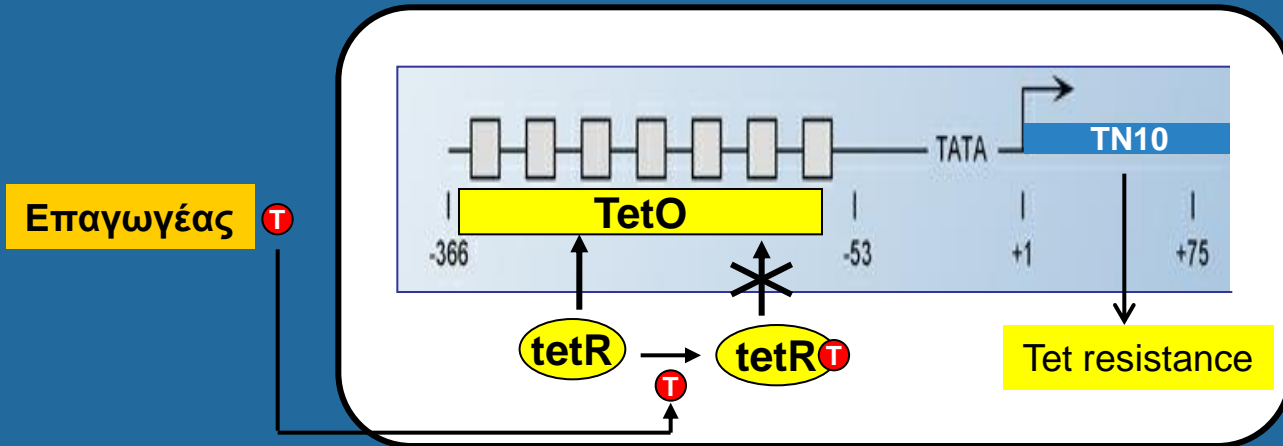
## Συστήματα έκφρασης διαγονιδίων

- Συστατικά συστήματα  (Υπ. Ακτίνης)
- Επαγωγίμα συστήματα  (Υπ. Hsp70)
- Ιστο-ειδικά συστήματα  (GAL4)
- Επαγωγίμα συστήματα με ελεγχόμενη έκφραση (Συστήματα Tet-off/on)

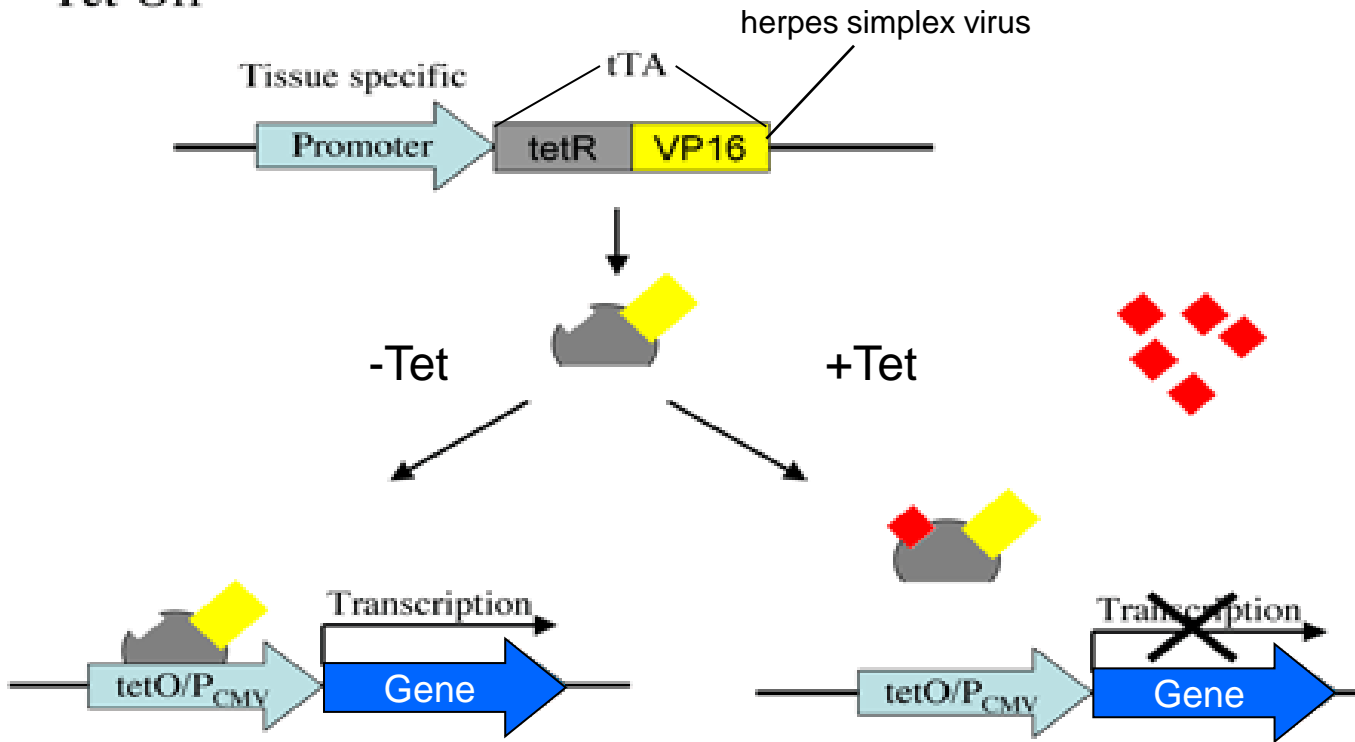
# Συστήματα ιστοειδικής έκφρασης (GAL4/UAS)



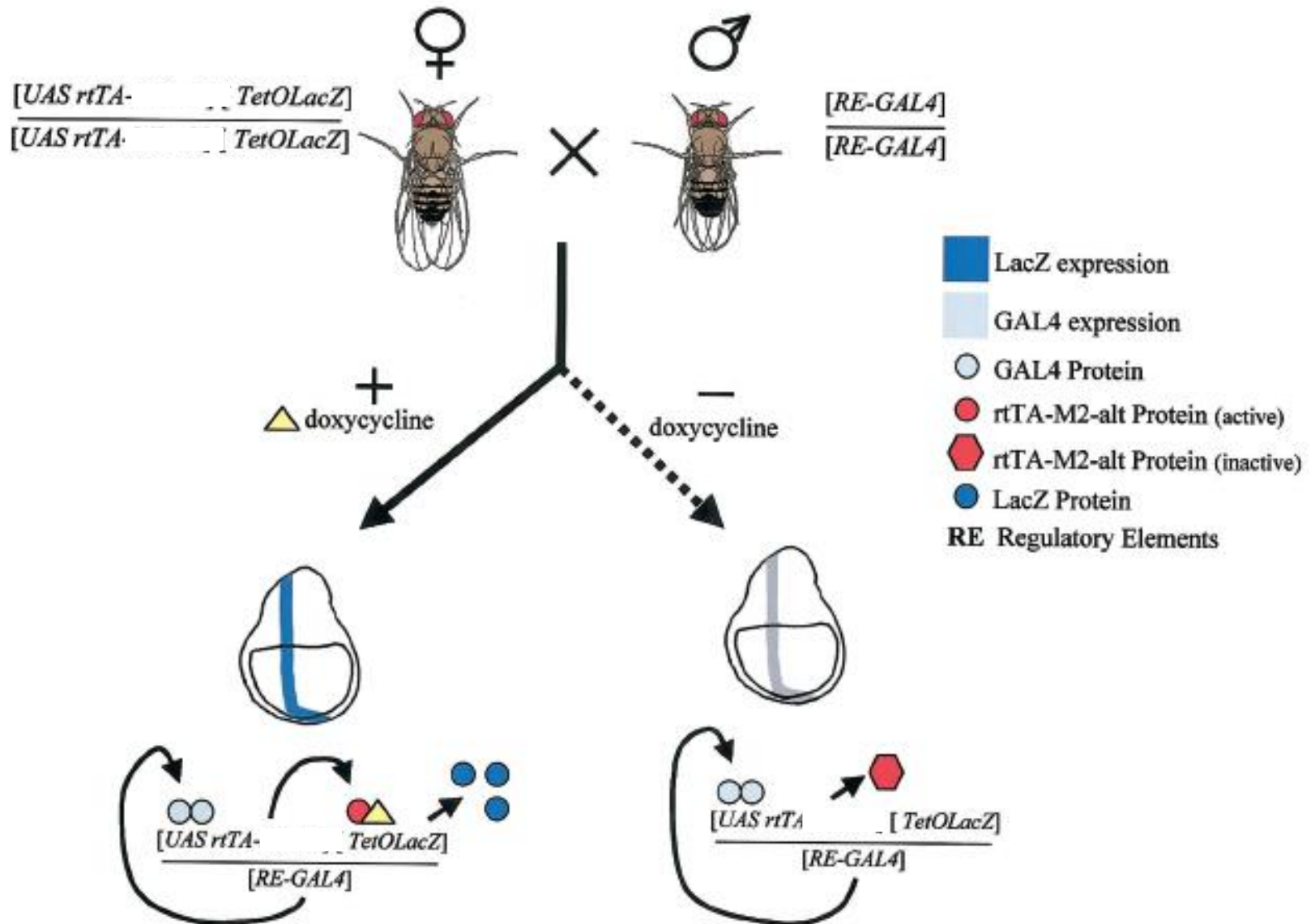
# Συστήματα χρονοειδικής έκφρασης (Tet-off/on)



## Tet-Off

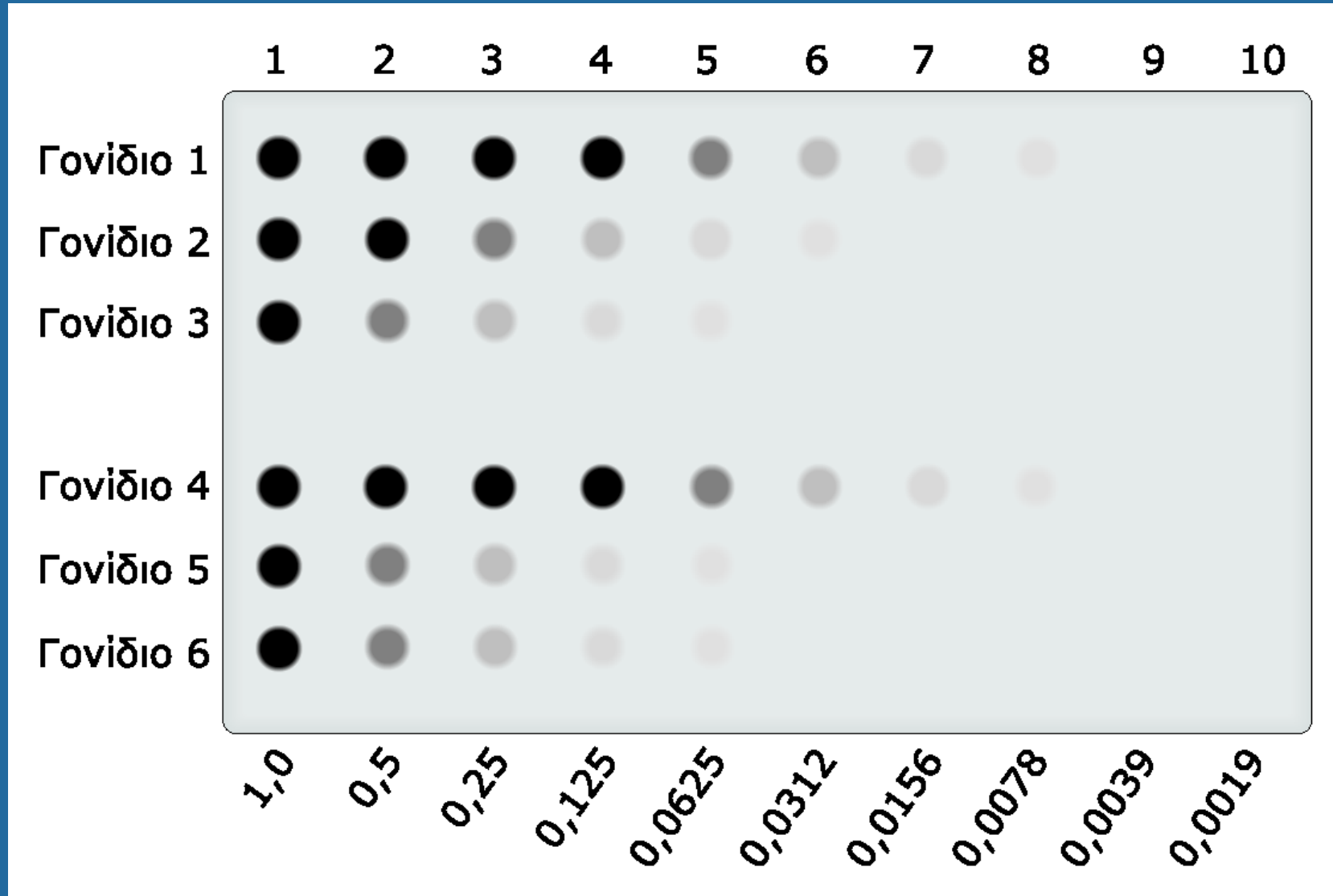


# GAL4/Tet-on



# Μέτρηση των επιπέδων mRNA με στύπωμα κουκκίδας και υβριδοποίηση.

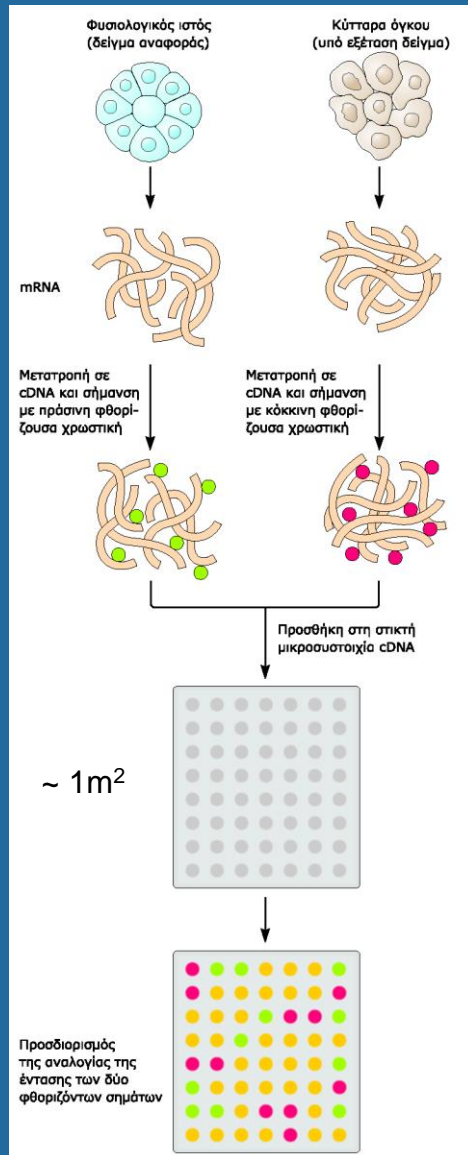
ΕΙΚΟΝΑ 13.1



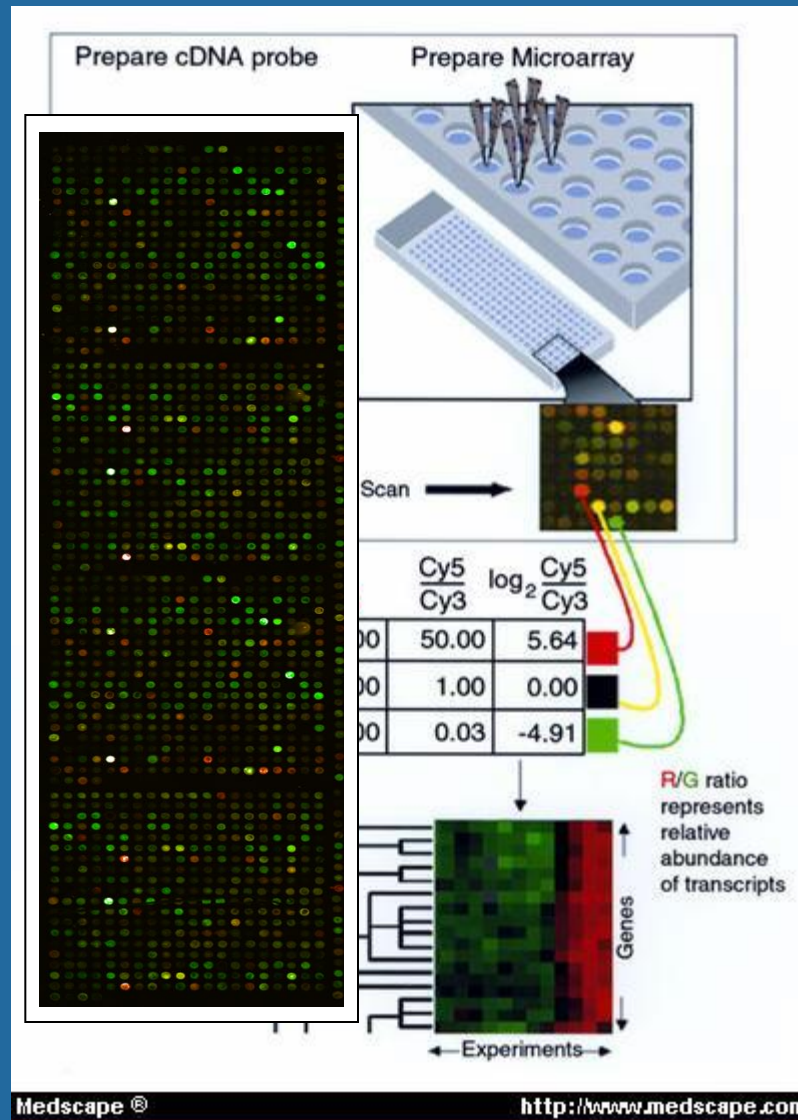


# Μικροσυτοιχίες DNA

EIKONA 13.5

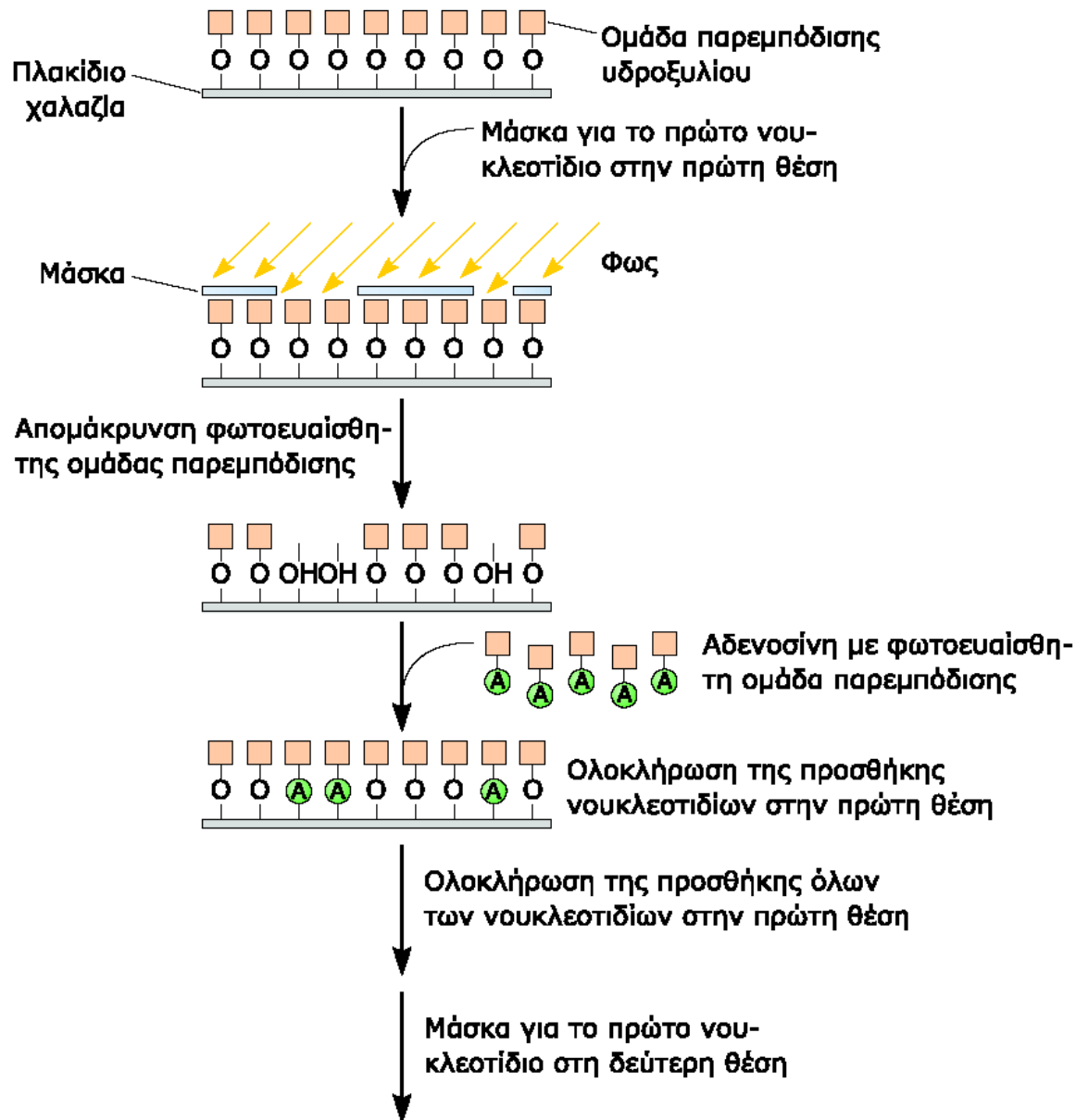


20.000/cm<sup>2</sup>

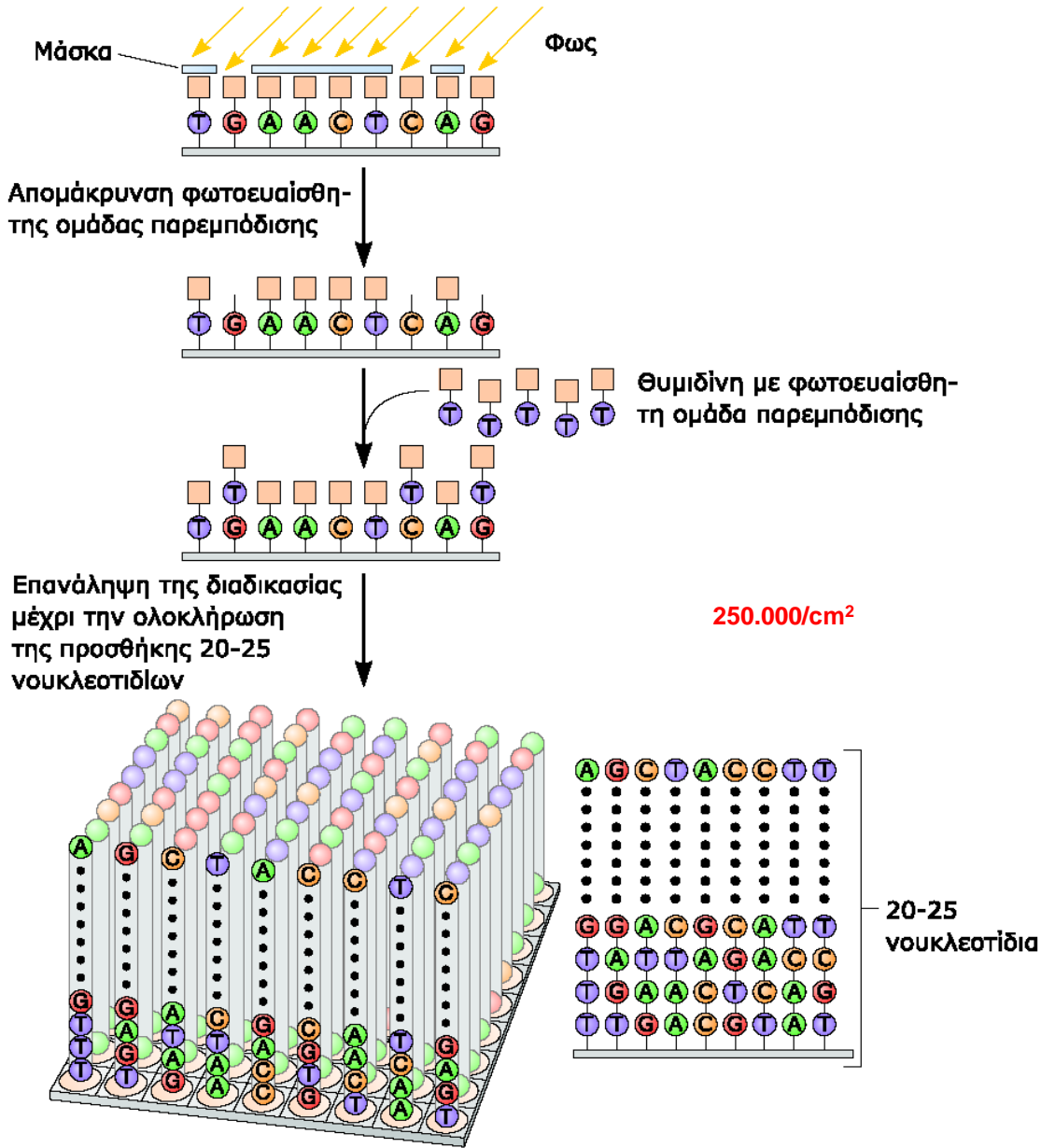


# Ανάλυση μεταγραφμάτων Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων

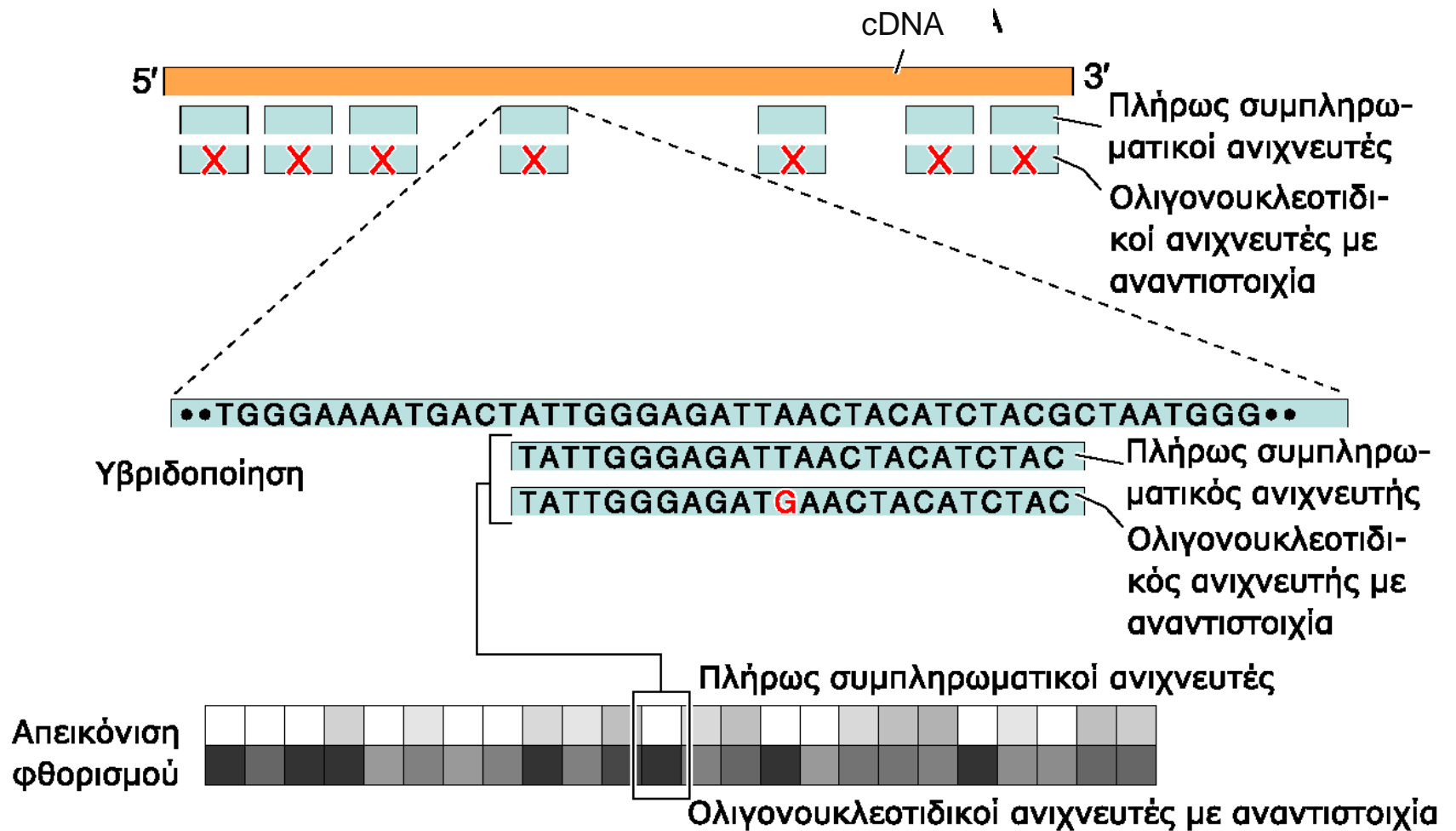
Σχήμα-84

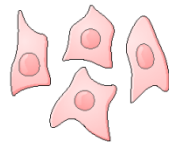


# Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων



# Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων

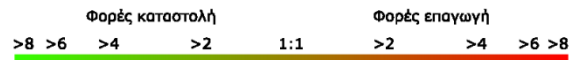
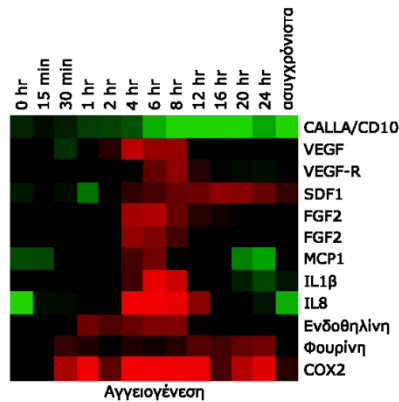
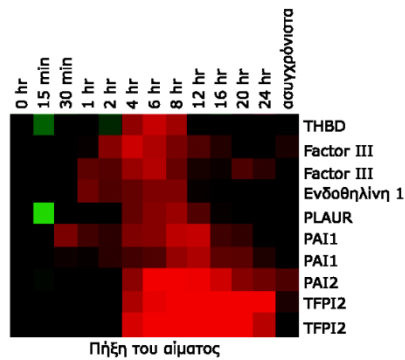
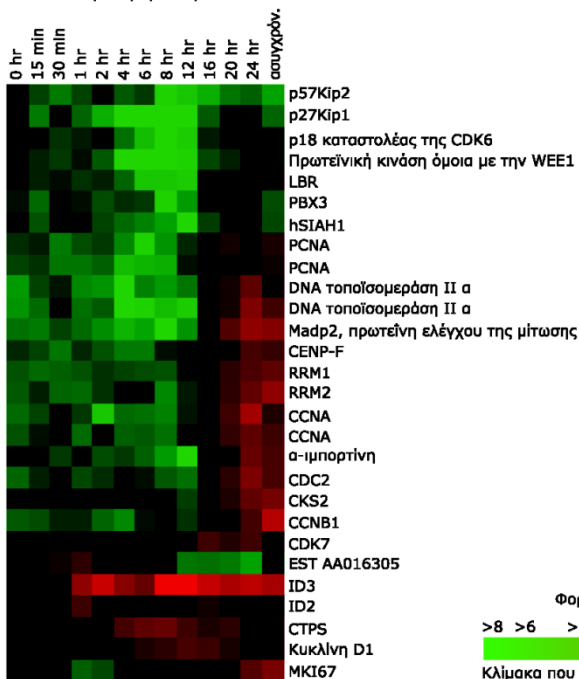
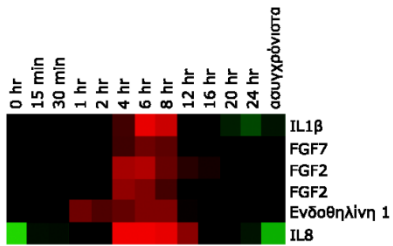




Μη πολλαπλασιαζόμενοι ανθρώπινοι ινοβλάστες  
(διατηρούνται σε καλλιέργεια απουσία ορού)

Προσθήκη ορού και επώαση,  
λήψη δειγμάτων σε δώδεκα χρονικές στιγμές

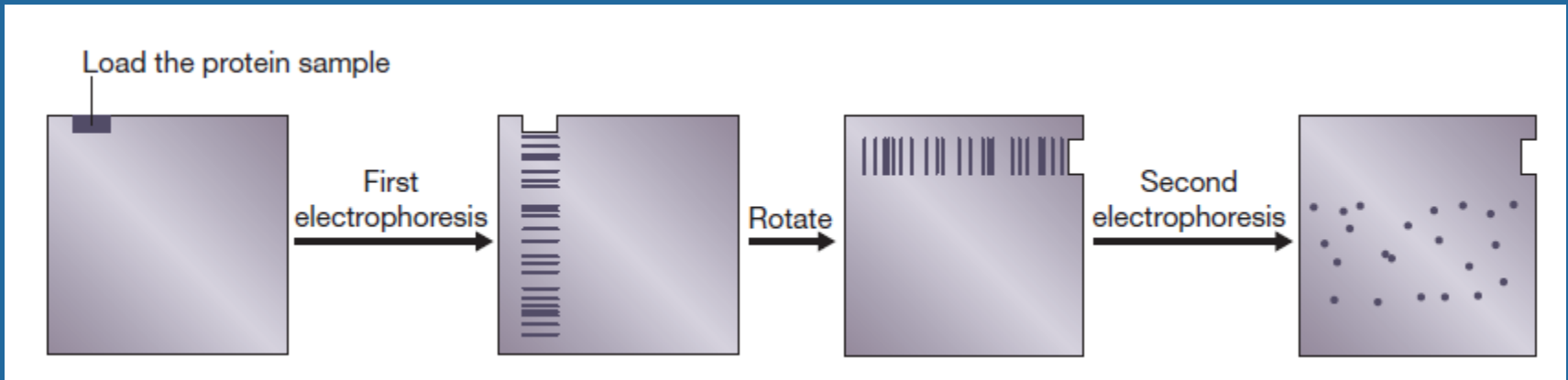
Απομόνωση mRNA και προσδιορισμός του προτύπου της  
γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση μιας στικτής μικροσυστοιχίας



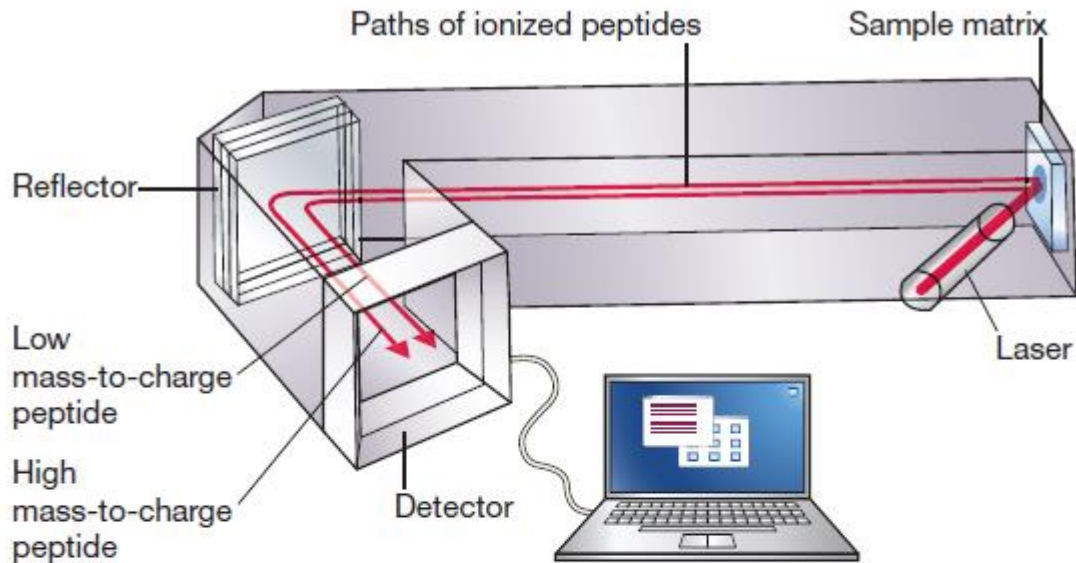
Κλίμακα που απεικονίζει το βαθμό επαγωγής ή καταστολής κάθε γονιδίου σε κύτταρα που έχουν διεγερθεί με ορό σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης πριν από τη διεγερση

## Ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA

# Πρωτεομική



(a) MALDI-TOF mass spectrometry



(b) MALDI-TOF spectrum

